



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122021015246-2 B1

(22) Data do Depósito: 25/10/2012

(45) Data de Concessão: 28/03/2023

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA INDUÇÃO DE LINFÓCITO T CITOTÓXICO (CTL), USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER E INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE CONTRA CÂNCER, BEM COMO MÉTODOS IN VITRO PARA INDUÇÃO DE CTL E CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO

(51) Int.Cl.: C07K 7/06; A61K 38/00; A61K 48/00; A61P 35/00; C07K 16/18; (...).

(30) Prioridade Unionista: 28/10/2011 US 61/552,817.

(73) Titular(es): ONCOTHERAPY SCIENCE, INC..

(72) Inventor(es): YUSUKE NAKAMURA; TAKUYA TSUNODA; RYUJI OSAWA; SACHIKO YOSHIMURA; TOMOHISA WATANABE; GAKU NAKAYAMA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2012006853 de 25/10/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/061594 de 02/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/08/2021

(62) Pedido Original do Dividido: BR112014009176-5 - 25/10/2012

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a peptídeos epitópicos isolados derivados de TOPK e fragmentos imunogênicos dos mesmos que têm uma capacidade de induzir linfócitos T citotóxicos (CTLs) e, assim, são apropriados para o uso em imunoterapia de câncer, mais particularmente como vacinas contra o câncer. Os peptídeos da presente invenção abrangem tanto peptídeos incluindo uma sequência de aminoácidos derivada de TOPK quanto versões modificadas dos mesmos em que um, dois ou vários aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos e/ou adicionados, contanto que essas versões modificadas tenham capacidade de indução de CTL. Além disso, são fornecidos polinucleotídeos que codificam qualquer um dos peptídeos mencionados acima, bem como composições farmacêuticas que incluem qualquer um dos peptídeos ou polinucleotídeos mencionados acima. Os peptídeos, os polinucleotídeos e as composições farmacêuticas da presente invenção encontram utilidade particular em qualquer um ou ambos dentre o tratamento e a prevenção de cânceres e tumores.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÃO PARA INDUÇÃO DE LINFÓCITO T CITOTÓXICO (CTL), USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER E INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE CONTRA CÂNCER, BEM COMO MÉTODOS *IN VITRO* PARA INDUÇÃO DE CTL E CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO"**.

Dividido do BR112014009176-5, depositado em 25.10.2012.

Campo Técnico

[001] A presente invenção refere-se ao campo de ciência biológica, mais especificamente ao campo de terapia de câncer. Em particular, a presente invenção refere-se a novos peptídeos que são eficazes como vacinas para o câncer e fármacos para qualquer um ou ambos de tratamento e prevenção de tumores.

Prioridade

[002] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos Estados Unidos Nº 61/552.817, depositado em 28 de Outubro de 2011, os conteúdos completos do qual são incorporados por referência aqui.

Antecedentes da Técnica

[003] Foi mostrado que linfócitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocytes - CTLs) CD8 positivos reconhecem peptídeos epitópicos derivados de antígenos associados a tumor (Tumor-Associated Antigens - TAAs) encontrados sobre a molécula do principal complexo de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex - MHC) da classe I e, então, matam as células tumorosas. Desde a descoberta da família de antígenos de melanoma (MAGE) como o primeiro exemplo de TAAs, muitos outros TAAs foram descobertos por meio de abordagens imunológicas (NPL 1, 2) e alguns dos TAAs estão agora no processo de desenvolvimento clínico como alvos imunoterapêuticos.

[004] TAAs favoráveis são indispensáveis para a proliferação e sobrevivência de células cancerosas. O uso de tais TAAs como alvos

para imunoterapia pode minimizar o risco bem descrito de escape imune de células cancerosas atribuível à deleção, mutação e/ou sub-regulação de TAAs como uma consequência de seleção imune acionada terapeuticamente. Consequentemente, a identificação de novos TAAs capazes de induzir à respostas imunes antitumor potentes e específicas garante o desenvolvimento adicional. Assim, aplicação clínica de estratégias de vacinação com peptídeos em vários tipos de cânceres está em andamento (NPL 3-10). Até o momento, têm havido vários relatos de ensaios clínicos usando estes peptídeos derivados de TAAs. Infelizmente, até o momento, estes ensaios de vacinas contra o câncer têm proporcionado apenas uma baixa taxa de resposta objetiva (NPL 11-13). Consequentemente, permanece uma necessidade na técnica por novos TAAs adequados para uso como alvos imunoterapêuticos.

[005] TOPK (quinase de proteína originada de célula T-LAK) é uma quinase de serina/treonina que é membro da família de quinase MAPKK relacionada à quinase MAPK (MAPKK) 3/6. Esta quinase fosforila MAPK p38 e participa na regulação do ponto de verificação do ciclo celular (NPL 14, 15). Análise de expressão gênica de TOPK usando amostras clínicas indicou que TOPK é abundante em alguns cânceres malignos, tais como câncer de mama, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, leucemia, câncer colo-retal e melanoma (NPL 16-19). Estudos recentes indicando que a atividade de quinase desempenha um papel importante em carcinogênese de mama têm renovado o interesse de pesquisa em quinases relacionadas ao câncer, tal como TOPK. Para essa finalidade, análise Northern blot revelou que o transcrito de TOPK é altamente expresso em células de câncer de mama, mas dificilmente é detectável em tecidos de órgãos normais, exceto testículo. Além disso, foi mostrado que *knockdown* de expressão de TOPK endógena por siRNA em linhagens de células de

câncer de mama atenua a citocinese e levar à apoptose das células cancerosas (NPL 20).

Lista de Citação

Literatura de Não Patente

- [006] [NPL 1] Boon T, Int J Cancer, 8 de Maio de 1993, 54(2): 177-80
- [007] [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med, 1 de Março de 1996, 183(3): 725-9
- [008] [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst, 16 de Outubro de 1996, 88(20): 1442-55
- [009] [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res, 1 de Julho de 1999, 59(13): 3134-42
- [0010] [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res, 1 de Novembro de 1999, 59(21): 5554-9
- [0011] [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol, 1 de Maio de 1996, 156(9): 3308-14
- [0012] [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res, 15 de Outubro de 1997, 57(20): 4465-8
- [0013] [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer, 18 de Janeiro de 1999, 80(2): 169-72
- [0014] [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer, 5 de Maio de 1999, 81(3): 459-66
- [0015] [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer, 5 de Maio de 1999, 81(3): 387-94
- [0016] [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol, 15 de Outubro de 2002, 20(20): 4169-80
- [0017] [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev, Outubro de 2002, 188: 33-42
- [0018] [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med, Setembro de 2004, 10(9): 909-15

[0019] [NPL 14] Abe Y et.al., J Bio Chem. 14 de Julho de 2000: 21525-21531

[0020] [NPL 15] Ayllon V and O'connor R., Oncogene. 24 de Maio de 2007; 26(24): 3451-61

[0021] [NPL 16] He F et al., Hum Pathol. Março de 2010; 41(3): 415-24

[0022] [NPL 17] Li G et al., Ann Hematol. Setembro de 2006; 85(9): 583-90

[0023] [NPL 18] Minoo P et al., Int J Oncol. Setembro de 2010; 37(3): 707-18

[0024] [NPL 19] Zykova TA et al., Clin Cancer Res. 1 de Dezembro de 2006; 12(23): 6884-93

[0025] [NPL 20] Park JH et al., Cancer Res. 15 de Setembro de 2006; 66(18): 9186-95

Sumário da Invenção

[0026] A presente invenção baseia-se, pelo menos em parte, na descoberta de novos peptídeos que podem servir como alvos adequados de imunoterapia. Em virtude do fato de que os TAAs são, em geral, percebidos pelo sistema imune como "próprios" e, portanto, frequentemente não têm imunogenicidade inata, a descoberta de alvos apropriados é de extrema importância. Por toda a presente invenção, TOPK (SEQ ID NO: 86 codificada pelo N° de Acesso ao GenBank NM_018492 (SEQ ID NO: 85)) é demonstrada como sendo especificamente superexpressa em células cancerosas, em particular leucemia mieloide aguda (Acute Myeloid Leukemia - AML), câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico do tipo difuso, câncer de pulmão de células não pequenas (Non-Small-Cell Lung Cancer - NSCLC), linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, câncer de pulmão de células pequenas (Small Cell Lung Câncer - SCLC) e tumor de

tecidos moles, porém sem limitação aos mesmos. Assim, a presente invenção se concentra sobre a TOPK como um alvo candidato apropriado de imunoterapia de câncer/tumor.

[0027] Para essa finalidade, a presente invenção é dirigida, pelo menos em parte, à identificação de peptídeos epitópicos específicos dentre os produtos gênicos de TOPK que possuem a capacidade de induzir a linfócitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocytes - CTLs) específicos à TOPK. Conforme discutido em maiores detalhes abaixo, células mononucleares de sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMCs) obtidas a partir de um doador saudável foram estimuladas usando peptídeos candidatos de ligação ao HLA (Human Leukocyte Antigen - Antígeno Leucocitário Humano)-A*2402 ou HLA-A*0201 derivados de TOPK. Linhagens de CTL foram, estão, estabelecidas com citotoxicidade específica contra as células alvo HLA-A24 ou HLA-A2 positivas que receberam um pulso com cada um dos peptídeos candidatos. Os resultados aqui demonstram que estes peptídeos são peptídeos epitópicos restritos a HLA-A24 ou HLA-A2 que podem induzir à respostas imunes potentes e específicas contra células que expressam TOPK. Estes resultados indicam ainda que TOPK é fortemente imunogênica e que os epítomos da mesma são alvos eficazes para imunoterapia de tumor.

[0028] Consequentemente, um objetivo da presente invenção é fornecer peptídeos isolados que têm uma capacidade de se ligar a um antígeno HLA e incluem a sequência de TOPK (SEQ ID NO: 86) ou um fragmento imunogenicamente ativo dos mesmos. Espera-se que estes peptídeos tenham capacidade de indução de CTL e, assim, possam ser usados para induzir a um CTL *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* ou sejam administrados diretamente a um indivíduo de modo a induzir à respostas imunes *in vivo* contra cânceres, exemplos dos quais incluem, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer

cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[0029] Peptídeos preferidos são nonapeptídeos e decapeptídeos e, mais preferivelmente, nonapeptídeos e decapeptídeos que têm uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84. Destes, os peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 são mais preferidos.

[0030] A presente invenção considera também peptídeos modificados que têm uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84, nas quais um, dois ou mais aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos e/ou adicionados, contanto que os peptídeos modificados resultantes retenham a capacidade de indução de CTL requerida do peptídeo não modificado original.

[0031] A presente invenção abrange ainda polinucleotídeos isolados que codificam qualquer um dos peptídeos da presente invenção. Estes polinucleotídeos podem ser usados para induzir ou preparar células que apresentam antígeno (Antigen Presenting Cells - APCs) tendo capacidade de indução de CTL. Assim como os peptídeos da presente invenção descritos acima, tais APCs podem ser administrados a um indivíduo para indução de respostas imunes contra cânceres.

[0032] Quando administrados a um indivíduo, os peptídeos da presente invenção são, de preferência, apresentados sobre a superfície de APCs de modo a induzir a CTLs que objetivam os respectivos peptídeos. Portanto, um objetivo da presente invenção é fornecer agentes ou composições para indução de um CTL, tais composições ou agentes incluindo um ou mais peptídeos da presente invenção ou um ou mais polinucleotídeos que codificam tais peptídeos. Tais agentes ou composições podem ser usados para o tratamento e/ou profila-

xia de um câncer primário, uma metástase ou recorrência pós-operatória do mesmo. Exemplos de cânceres alvo considerados pela presente invenção incluem, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[0033] A presente invenção considera ainda composições ou agentes farmacêuticos que incluem um ou mais peptídeos ou um ou mais polinucleotídeos da presente invenção formulados para o tratamento e/ou profilaxia de um câncer primário, metástase ou recorrência de câncer pós-operatória, conforme mencionado acima. Em vez de ou além dos presentes peptídeos ou polinucleotídeos, os presentes agentes e/ou composições farmacêuticas podem incluir, como ingredientes ativos, APCs e/ou exossomas que apresentam qualquer um dos peptídeos da presente invenção.

[0034] Os peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção podem ser usados para induzir a APCs que se apresentam sobre a superfície de um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção, por exemplo, mediante contato de APCs derivadas de um indivíduo com o peptídeo da presente invenção ou introdução de um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção em APCs. Tais APCs têm alta capacidade de indução de CTL contra peptídeos alvo e são úteis para imunoterapia de câncer. Consequentemente, a presente invenção abrange os métodos para indução de APCs com capacidade de indução de CTL, bem como APCs obtidas pelos métodos.

[0035] É ainda outro objetivo da presente invenção fornecer métodos para indução de CTLs, tais métodos incluindo a etapa de cocultura de células T CD8 positivas com APCs que apresentam, sobre sua su-

perfície, um completo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção, a etapa de cocultura de células T CD8 positivas com exossomas que apresentam, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção ou a etapa de introdução de um polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam polipeptídeos subunitários de receptor de células T (T Cell Receptor - TCR), em que o TCR formado pelos polipeptídeos subunitários pode se ligar a um peptídeo da presente invenção. CTLs obtidos por meio de tais métodos encontram uso no tratamento e/ou prevenção de cânceres, mais particularmente AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles. Consequentemente, é ainda outro objetivo da presente invenção abranger os métodos para indução de CTLs, bem como os CTLs obtidos por meio dos métodos. Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar APCs isoladas que apresentam, sobre a superfície, um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção. A presente invenção proporciona ainda CTLs isolados que objetivam peptídeos da presente invenção. Estas APCs e CTLs podem ser usados para imunoterapia de câncer.

[0036] É ainda outro objetivo da presente invenção fornecer métodos para indução de uma resposta imune contra um câncer em um indivíduo que precisa do mesmo, tais métodos incluindo a etapa de administração, ao indivíduo, de uma composição que inclui pelo menos um componente selecionado dentre um peptídeo da presente invenção, um polinucleotídeo que codifica tal peptídeo, exossomos ou APCs que apresentam tais peptídeos e CTLs que podem reconhecer células que apresentam tais peptídeos sobre sua superfície.

[0037] A aplicabilidade da presente invenção se estende a qual-

quer uma de uma série de doenças relacionadas a ou advindas de superexpressão de TOPK, tais como cânceres que expressam TOPK, exemplos das quais incluem, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[0038] Objetivos e características da invenção se tornarão mais completamente evidentes quando a descrição detalhada a seguir é lida em conjunto com as figuras e exemplos em anexo. Deve ser entendido que o sumário precedente da presente invenção e a descrição detalhada a seguir são de modalidades exemplificativas e não são restritivas da presente invenção ou outras modalidades alternativas da presente invenção.

[0039] Em particular, embora a invenção seja aqui descrita com referência a uma série de modalidades específicas, será apreciado que a descrição é ilustrativa da invenção e não deve ser interpretada como limitativa da invenção. Várias modificações e aplicações podem ocorrer para aqueles versados na técnica, sem se desviar do espírito e âmbito da invenção, conforme descrito pelas reivindicações em anexo. Similarmente, outros objetivos, características, benefícios e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes a partir deste sumário e determinadas modalidades descritas abaixo e serão prontamente evidentes para aqueles versados na técnica. Tais objetivos, características, benefícios e vantagens se tornarão evidentes a partir do acima em conjunto com os exemplos, dados, figuras e todas as inferências concluídas a partir dos mesmos, isoladamente ou levando em consideração as referências aqui incorporadas.

Breve Descrição dos Desenhos

[0040] Vários aspectos e aplicações da presente invenção se tor-

narão evidentes para aqueles versados na técnica quando de consideração da breve descrição das figuras e da descrição detalhada da presente invenção e suas modalidades preferidas que seguem.

Figura 1

[0041] A Figura 1 é constituída de uma série de fotografias (a) - (e) que representam os resultados de ensaio Immunospot enzima ligado (ELISPOT) de interferon (IFN)-gama em CTLs que foram induzidos com peptídeos derivados de TOPK. Os CTLs na cavidade número # 8 induzidos com TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), em #3 induzidos com TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), em #3 induzidos com TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), em #2 induzidos com TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) e em #4 induzidos com TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e) mostraram produção potente de IFN-gama quando comparado com o controle, respectivamente. O quadrado na cavidade destas imagens indica que as células da cavidade correspondente foram expandidas para estabelecer linhagens de CTL. Em contraste, conforme é típico de dados negativos, nenhuma produção de IFN-gama específica foi observada a partir do CTL estimulado com TOPK-A24-9-289 (SEQ ID NO: 1) (f) . Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos.

Figura 2-1

[0042] A Figura 2 é constituída de uma série de fotografias, (a) - (o), que representam os resultados de ensaio Immunospot enzima ligado (ELISPOT) de interferon (IFN)-gama sobre CTLs que foram induzidos com peptídeos derivados de TOPK. Os CTLs na cavidade número #7 induzidos com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), em #4 induzidos com TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), em #2 induzidos com TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47) (c), em #8 induzidos com

TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (d), em #4 induced with TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (e), em #3 induzidos com TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (f), em #3 induzidos com TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (g), em #5 induzidos com TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (h), em #3 induzidos com TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (i), em #8 induzidos com TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (j), em #1 induzidos com TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (k) e em #1 induzidos com TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71) (l) mostraram potente produção de IFN-gama quando comparado com o controle, respectivamente. O quadrado na parte inferior destas fotografias indica que as células da cavidade correspondente foram expandidas para estabelecer linhagens de CTL. Em contraste, conforme é típico de dados negativos, nenhuma produção de IFN-gama específica foi observada a partir do CTL estimulado com TOPK-A02-9-55 (SEQ ID NO: 41) (o). Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos.

Figura 2-2

[0043] A Figura 2 é constituída de uma série de fotografias, (a) - (o), que representam os resultados de ensaio Immunospot enzima ligado (ELISPOT) de interferon (IFN)-gama sobre CTLs que foram induzidos com peptídeos derivados de TOPK. Os CTLs em #4 induzidos com TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (m) e em #4 induzidos com TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) (n) mostraram produção potente de IFN-gama comparado com o controle, respectivamente. O quadrado na parte inferior destas fotografias indica que as células da cavidade correspondente foram expandidas para estabelecer linhagens de CTL. Em contraste, conforme é o caso típico para dados negativos, nenhuma produção específica de IFN-gama foi observada a partir do

CTL estimulado com TOPK-A02-9-55 (SEQ ID NO: 41) (o). Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos.

Figura 3

[0044] A Figura 3 é constituída de uma série de gráficos de linhas, (a) - (e), que descrevem a produção de IFN-gama das linhagens de CTL estimuladas com TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) e TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e). A quantidade de IFN-gama que os CTLs produziram foi medida pelo ensaio imunoabsorvente enzima ligado (ELISA) de IFN-gama. Os resultados demonstram que linhagens de CTL estabelecidas por meio de estimulação com cada peptídeo mostram produção potente de IFN-gama quando comparado com o controle. Na figura, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos. A proporção R/S indica a proporção do número de células respondedoras (linhagem de CTL) e células estimuladoras.

Figura 4

[0045] A Figura 4 é constituída de uma série de gráficos de linhas, (a) - (c), que representam produção de IFN-gama dos clones de CTL estabelecidos por diluição limitativa a partir das linhagens de CTL estimuladas com TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (a), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (b) e TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (c). Os resultados demonstram que os clones de CTL estabelecidos por estimulação com cada peptídeo mostram produção potente de IFN-gama quando comparado com o controle. Na figura, "+" indica a produção de

IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos. A proporção R/S indica a proporção do número de células respondedoras (linhagem de CTL) e células estimuladoras.

Figura 5-1

[0046] A Figura 5-1 é constituída de uma série de gráficos de linhas, (a) - (f), que descrevem a produção de IFN-gama das linhagens de CTL estimuladas com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (c), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (d), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (e) e TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (f). A quantidade de IFN-gama que os CTLs produziram foi medida pelo ensaio imunoabsorvente enzima ligado (ELISA) de IFN-gama. Os resultados demonstram que as linhagens de CTL estabelecidas por estimulação com cada peptídeo mostram produção potente de IFN-gama quando comparado com o controle. Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos. A proporção R/S indica a proporção do número de células respondedoras (linhagem de CTL) e células estimuladoras.

Figura 5-2

[0047] A Figura 5-2 é constituída de uma série de gráficos de linhas, (g) - (k), que descrevem a produção de IFN-gama das linhagens de CTL estimuladas com TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (g), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (h), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (i), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (j) e TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (k). A quantidade de IFN-gama que os CTLs produziram foi medida pelo ensaio imunoabsorvente enzima ligado (ELISA) de

IFN-gama. Os resultados demonstram que as linhagens de CTL estabelecidas por estimulação com cada peptídeo mostram produção potente de IFN-gama quando comparado com o controle. Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos. A proporção R/S indica a proporção do número de células respondedoras (linhagem de CTL) e células estimuladoras.

Figura 6

[0048] A Figura 6 é constituída de um par de gráficos de linha, (a) e (b), que representam a produção de IFN-gama dos clones de CTL estabelecidos por diluição limitativa a partir de linhagens de CTL estimuladas com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a) e TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO:53) (b). Os resultados demonstram que os clones de CTL estabelecidos por meio de estimulação com cada peptídeo mostram produção potente de IFN-gama quando comparado com o controle. Na figura, "+" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo apropriado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células alvo que não receberam um pulso com quaisquer peptídeos. A proporção R/S indica a proporção do número de células respondedoras (linhagem de CTL) e células estimuladoras.

Figura 7

[0049] A Figura 7 é um gráfico de linha que representa a atividade de CTL específica de clones de CTL contra as células alvo que expressam TOPK e HLA-A*2402. Células COS7 transfectadas com HLA-A*2402 ou o gene de TOPK de comprimento completo foram preparadas como os controles. O clone de CTL estabelecido com TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) mostrou atividade específica de CTL contra células COS7 transfectadas com TOPK e HLA-A*2402 (losango). Por

outro lado, nenhuma atividade de CTL específica foi detectada contra células alvo que expressam HLA-A*2402 (triângulo) ou TOPK (círculo).

Figura 8

[0050] A Figura 8 é um gráfico de linha que representa a atividade específica de linhagens de CTL contra as células alvo que expressam TOPK e HLA-A*0201. Células COS7 transfectadas com HLA-A*0201 ou o gene de TOPK de comprimento total foram preparadas como os controles. A linhagem de CTL estabelecida com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) mostrou atividade específica de CTL contra células COS7 transfectadas com TOPK e HLA-A*0201 (losango). Por outro lado, nenhuma atividade específica de CTL foi detectada contra células alvo que expressam HLA-A*0201 (triângulo) ou TOPK (círculo).

Descrição de Modalidades

[0051] Além do sumário acima, é um objetivo da presente invenção proporcionar:

[0052] [1] Um peptídeo isolado tendo capacidade de indução de CTL, em que o peptídeo consiste na sequência de aminoácidos de TOPK ou um fragmento imunologicamente ativo do mesmo.

[0053] [2] O peptídeo isolado de [1], em que o peptídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76.

[0054] [3] Um peptídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

[0055] um peptídeo isolado de (a) ou (b) a seguir:

[0056] um peptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28,

[0057] um peptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 3,

6, 27 e 28, em que 1, 2 ou mais aminoácidos são substituídos, inseridos, deletados e/ou adicionados, em que o peptídeo tem capacidade de indução de CTL,

[0058] um peptídeo isolado de (c) ou (d) a seguir:

[0059] (c) um peptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76,

[0060] (d) um peptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76, em que 1, 2 ou vários aminoácidos são substituídos, inseridos, deletados e/ou adicionados, em que o peptídeo tem capacidade de indução de CTL.

[0061] [4] O peptídeo isolado de [3], em que o peptídeo tem uma ou ambas das seguintes características:

[0062] o segundo amino ácido a partir do N-término de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28 é substituído para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em fenilalanina, tirosina, metionina e triptofano; e

[0063] o aminoácido C-terminal de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 3, 6, 27 e 28 é substituído para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano e metionina.

[0064] [5] O peptídeo isolado de [3], em que o peptídeo tem uma ou ambas das seguintes características:

[0065] o segundo amino ácido a partir do N-término de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 é substituído para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em leucina e metionina; e

[0066] o aminoácido C-terminal de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 and 7642, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 é substituído para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em valina e leucina.

[0067] [6] O peptídeo isolado de qualquer um de [1] a [7], em que o referido peptídeo tem uma capacidade de se ligar a um antígeno HLA.

[0068] [7] O peptídeo isolado de [6], em que o referido antígeno HLA é HLA-A24 ou HLA-A2.

[0069] [8] O peptídeo isolado de qualquer um de [1] a [7], em que o referido peptídeo é um nonapeptídeo ou decapeptídeo.

[0070] [9] Um polinucleotídeo isolado que codifica o peptídeo isolado de qualquer um de [1] a [8].

[0071] [10] Uma composição para indução de um CTL, em que a composição compreende um ou mais peptídeos de qualquer um de [1] a [8] ou um ou mais polinucleotídeos de [9].

[0072] [11] Uma composição farmacêutica compreendendo:

[0073] um ou mais peptídeo(s) de qualquer um de [1] a [8],

[0074] um ou mais polinucleotídeo(s) de [9],

[0075] uma ou mais APC(s) que apresentam um complexo do peptídeo de qualquer um de [1] a [8] e um antígeno HLA sobre sua superfície;

[0076] um ou mais exossomos que apresentam um complexo do peptídeo de qualquer um de [1] a [8] e um antígeno HLA sobre sua superfície, ou

[0077] um ou mais CTLs que podem reconhecer uma célula que apresenta um complexo do peptídeo de qualquer um de [1] a [8] e um antígeno HLA sobre sua superfície,

[0078] em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitá-

vel,

[0079] em que a composição farmacêutica é formulada para o tratamento e/ou profilaxia de câncer, a prevenção de uma recorrência pós-operatória do mesmo e/ou a indução de uma resposta imune contra câncer.

[0080] [12] A composição farmacêutica de [11], em que a referida composição farmacêutica é formulada para administração a um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A24 ou HLA-A2.

[0081] [13] Um método para indução de uma célula que apresenta antígeno (Antigen-Presenting Cell - APC) com capacidade de indução de CTL, o referido método compreendendo a etapa selecionada do grupo que consiste em:

[0082] contato de uma APC com um peptídeo de qualquer um de [1] a [8], *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*; e

[0083] introdução de um polinucleotídeo que codifica o peptídeo de acordo com qualquer de [1] a [8] em uma APC.

[0084] [14] Um método para indução de um CTL, o referido método compreendendo uma etapa selecionada do grupo que consiste em:

[0085] cocultura de uma célula T CD8 positiva com uma APC que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo de qualquer um de [1] a [8];

[0086] cocultura de uma célula T CD8 positiva com um exossomo que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo de qualquer um de [1] a [8]; e

[0087] introdução, em uma célula T CD8 positiva, de um polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam polipeptídeos subunitários de receptor de células T (T Cell Receptor - TCR), em que o TCR formado pelos referidos polipeptídeos subunitários de TCR é capaz de ligação a um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo de qualquer um de [1] a [8] sobre a superfície de uma célula T.

[0088] [15] Uma APC isolada que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo de qualquer um de [1] a [8].

[0089] [16] A APC de [15], a qual é induzida por meio do método de [13].

[0090] [17] O CTL isolado que objetiva o peptídeo de qualquer um de [1] a [8].

[0091] [18] O CTL de [17], o qual é induzido por meio do método de [14].

[0092] [19] Um método de indução de uma resposta imune contra o câncer em um indivíduo, o referido método compreendendo a etapa de administração, ao indivíduo, de uma composição compreendendo o peptídeo de acordo com qualquer de [1] a [8], um fragmento imunologicamente ativo do mesmo ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou o fragmento.

[0093] [20] Um anticorpo ou fragmento imunologicamente ativo do mesmo contra o peptídeo de qualquer um de [1] a [8].

[0094] [21] Um vetor compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo de qualquer um de [1] a [8].

[0095] [22] Uma célula hospedeira transformada ou transfectada com o vetor de expressão de [21].

[0096] [23] Um kit diagnóstico compreendendo o peptídeo de qualquer um de [1] a [8], o polinucleotídeo de [9] ou o anticorpo de [20].

[0097] [24] Um método de rastreio de um peptídeo tendo uma capacidade de induzir a um CTL que tem atividade citotóxica específica contra uma célula que apresenta um fragmento derivado de TOPK, em que o método compreende as etapas de:

[0098] (i) fornecimento de uma sequência candidata que consiste em uma sequência de aminoácidos modificada por substituição, dele-

ção, inserção e/ou adição de um, dois ou vários resíduos de aminoácidos em uma sequência de aminoácidos original, em que a sequência de aminoácido original é selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76;

[0099] (ii) seleção de uma sequência candidata que não têm homologia significativa substancial com peptídeos derivados de quaisquer outros produtos gênicos humanos conhecidos que não TOPK;

[00100] (iii) contato de um peptídeo que consiste na sequência candidata selecionada na etapa (ii) com uma célula que apresenta antígeno;

[00101] (iv) contato da célula que apresenta antígeno da etapa (iii) com uma célula T CD8 positiva; e

[00102] (v) identificação do peptídeo cuja capacidade de indução de CTL é mesma ou maior do que um peptídeo que consiste na sequência de aminoácidos original.

[00103] Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste de modalidades da presente invenção, os métodos, dispositivos e materiais preferidos são agora descritos. Entretanto, antes que os presentes materiais e métodos sejam descritos, deverá ser entendido que estas descrições são meramente ilustrativas e não se destinam a ser limitativas. Deverá também ser entendido que a presente invenção não está limitada aos tamanhos, formatos, dimensões, materiais, metodologias, protocolos particulares, etc. aqui descritos, uma vez que eles podem variar de acordo com experimentação e otimização de rotina. Além disso, a terminologia usada na descrição é para fins de descrição das versões ou modalidades particulares apenas e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção, o qual estará limitado apenas pelas reivindicações em anexo.

[00104] A descrição de cada publicação, patente ou pedido de patente mencionada no presente relatório descritivo é aqui especificamente incorporada por referência na íntegra. Entretanto, nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que a invenção não tem o direito à titularidade de antedatar a tal descrição em virtude de invenção anterior.

[00105] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aqueles versados na técnica ao qual a presente invenção pertence. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são meramente ilustrativos e não se destinam a ser limitativos.

Definições

[00106] Os artigos "um", "uma", "o" e "a", conforme usado aqui, significam "pelo menos um", a menos que especificamente indicado de forma diferente.

[00107] Os termos "isolado" e "purificado", usados em relação a uma substância (por exemplo, peptídeos, anticorpos, polinucleotídeos, etc.), indicam que a substância é substancialmente livre de pelo menos uma substância que possa estar incluída na fonte natural. Assim, um peptídeo isolado ou purificado refere-se um peptídeo que é substancialmente livre de material celular, tais como carboidratos, lipídios ou outras proteínas contaminantes da fonte celular ou tecidual a partir da qual o peptídeo é derivado ou substancialmente livres de precursores químicos ou outras substâncias químicas quando sintetizados quimicamente.

[00108] O termo "substancialmente livre de material celular" inclui preparados de um peptídeo nos quais o peptídeo está separado dos componentes celulares das células das quais ele é isolado ou recom-

binantemente produzido. Assim, um peptídeo que é substancialmente livre de material celular inclui preparados polipeptídicos que têm menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (em peso seco) de proteína heteróloga (também referida aqui como uma "proteína contaminante"). Quando o peptídeo é produzido recombinantemente, ele também é, de preferência, substancialmente livre de meio de cultura, o qual inclui preparados peptídicos com meio de cultura a menos de cerca de 20%, 10% ou 5% do volume do preparado peptídico. Quando o peptídeo é produzido por meio de síntese química, ele é, de preferência, substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos, o qual inclui preparados peptídicos com precursores químicos ou outros produtos químicos envolvidos na síntese do peptídeo a menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (em peso seco) do volume do preparo peptídico. Se um preparado peptídico em particular contém um peptídeo isolado ou purificado pode ser demonstrado, por exemplo, pelo aparecimento de uma banda única após eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (Sodium Dodecyl Sulfate - SDS)-poliacrilamida do preparado de proteína e coloração com Coomassie Brilliant Blue ou similar do gel. Em uma modalidade preferida, peptídeos e polinucleotídeos da presente invenção são isolados ou purificados.

[00109] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados aqui alternadamente para referir-se a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um ou mais resíduos modificados ou resíduos que não ocorrem naturalmente, tal como um mimético químico artificial de (um) aminoácido(s) que ocorre(m) naturalmente correspondente, bem como polímeros de aminoácidos que ocorrem naturalmente.

[00110] O termo "oligopeptídeo", algumas vezes usado no presente relatório descritivo, é usado para referir-se a peptídeos os quais têm

um comprimento de 20 resíduos de aminoácido ou menos, tipicamente 15 resíduos de aminoácido ou menos e, tipicamente, são constituídos de entre cerca de 8 e cerca de 11 resíduos de aminoácido, frequentemente 9 ou 10 resíduos de aminoácido. Os últimos são referidos aqui como "nonapeptídeo" e "decapeptídeo", respectivamente.

[00111] O termo "aminoácido", conforme usado aqui, refere-se a aminoácidos que ocorrem naturalmente e sintéticos, bem como análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que funcionam similarmente aos aminoácidos que ocorrem naturalmente. Aminoácidos podem ser L-aminoácidos ou D-aminoácidos. Aminoácidos que ocorrem naturalmente são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles modificados após tradução em células (por exemplo, hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato e O-fosfoserina). A frase "análogo de aminoácido" refere-se a compostos que têm a mesma estrutura química básica (um carbono alfa ligado a um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino e um grupo R) que um aminoácido que ocorrem naturalmente, mas têm um grupo R modificado ou esqueletos modificados (por exemplo, homosserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina-metil-sulfônio). A frase "mimético de aminoácido" refere-se a compostos químicos que têm estruturas diferentes, mas funções similares aos aminoácidos em geral.

[00112] Os aminoácidos podem ser aqui referidos por seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou os seus símbolos de uma letra recomendados pela IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

[00113] Os termos "gene", "polinucleotídeo", "oligonucleotídeo" e "ácido nucleico" são usados aqui alternadamente e, a menos que de outro modo especificamente indicado, são referidos por seus códigos de uma letra comumente aceitos.

[00114] Os termos "agente" e "composição" são usados aqui alter-

nadamente para referir-se a um produto que inclui os ingredientes especificados em quantidades especificadas, bem como qualquer produto que resulta, direta ou indiretamente, da combinação dos ingredientes especificados nas quantidades especificadas. Tais termos, quando usados em relação ao modificador "farmacêutica" (conforme em "composição farmacêutica"), se destinam a abranger um produto incluindo o(s) ingrediente(s) ativo(s) e o(s) ingrediente(s) inerte(s) que constituem o veículo, bem como qualquer produto o qual resulta, direta ou indiretamente, da combinação, formação de complexo ou agregação de quaisquer dois ou mais dos ingredientes ou da dissociação de um ou mais dos ingredientes ou de outros tipos reações ou interações de um ou mais dos ingredientes. Consequentemente, no contexto da presente invenção, os termos "agente farmacêutico" e "composição farmacêutica" referem-se a quaisquer produtos feitos por meio de mistura de uma molécula ou composto da presente invenção e um veículo farmacêutica ou fisiologicamente aceitável.

[00115] O termo "ingrediente ativo" aqui refere-se a uma substância em um agente ou composição que é biológica ou fisiologicamente ativo. Particularmente, no contexto de agente ou composição farmacêutica, o termo "ingrediente ativo" refere-se a uma substância componente que mostra um efeito farmacológico objetivo. Por exemplo, no caso de agentes ou composições farmacêuticas para uso no tratamento ou prevenção de câncer, ingredientes ativos nos agentes ou composições podem levar a pelo menos uma ação biológica ou fisiológica em células e/ou tecidos cancerosos, direta ou indiretamente. De preferência, tal ação pode incluir redução ou inibição de crescimento de células cancerosas, dano ou morte de células e/ou tecidos cancerosos e assim por diante. Tipicamente, o efeito indireto de ingredientes ativos é indução de CTLs que reconhecem ou matam células cancerosas. Antes de ser formulado, o "ingrediente ativo" pode também ser referido

como "a granel", "fármaco" ou "produto técnico".

[00116] A frase "veículo farmaceuticamente aceitável" ou "veículo fisiologicamente aceitável", conforme usado aqui, significa um material, composição, substância ou veículo farmacêutica ou fisiologicamente aceitável incluindo, porém sem limitações, um material de enchimento líquido ou sólido, diluente, excipiente, solvente ou material de encapsulação.

[00117] Alguns agentes ou composições farmacêuticas da presente invenção encontram uso particular como vacinas. No contexto da presente invenção, o termo "vacina" (referido também como uma "composição imunogênica") refere-se a um agente ou composição que tem a função de aprimorar, intensificar e/ou induzir à imunidade antitumor quando de inoculação em animais.

[00118] A menos que de outro modo definido, o termo "câncer" refere-se a cânceres ou tumores que superexpressam o gene de TOPK, exemplos dos quais incluem, porém sem limitações, leucemia mieloide aguda (Acute Myeloid Leukemia - AML), câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, câncer de pulmão de células não pequenas (Non-Small-Cell Lung Cancer - NSCLC), osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, câncer de pulmão de células pequenas (Small-Cell Lung Cancer - SCLC) e tumor de tecidos moles.

[00119] A menos que de outro modo definido, os termos "linfócito T citotóxico", "célula T citotóxica" e "CTL" são usados alternadamente aqui e, a menos que de outro modo especificamente indicado, referem-se a um subgrupo de linfócitos T que são capazes de reconhecer células não próprias (por exemplo, células tumorosas/cancerosas, células infectadas com vírus) e induzir à morte de tais células.

[00120] A menos que de outro modo definido, o termo "HLA-A24" refere-se ao tipo HLA-A24 que contém os subtipos, exemplos dos

quais incluem, porém sem limitações, HLA-A*2401, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2404, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2420, HLA-A*2425 e HLA-A*2488.

[00121] A menos que de outro modo definido, o termo "HLA-A2", conforme usado aqui, refere-se representativamente aos subtipos, exemplos dos quais incluem, porém sem limitações, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 e HLA-A*0250.

[00122] A menos que de outro modo definido, o termo "*kit*", conforme usado aqui, é utilizado em referência a uma combinação de reagentes e outros materiais. Considera-se aqui que o *kit* pode incluir microarranjo, *chip*, marcador e assim por diante. Não se pretende que o termo "*kit*" esteja limitado a uma combinação particular de reagentes e/ou materiais.

[00123] Conforme usado aqui, no contexto de um indivíduo ou paciente, a frase "antígeno HLA do indivíduo (ou paciente) é HLA A24 ou HLA-A2" refere-se àquele indivíduo ou paciente que possui, de forma homozigótica ou heterozigótica, o gene do antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 como uma molécula do Principal Complexo de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex - MHC) da Classe I e o antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 é expresso em células do indivíduo ou paciente como um antígeno HLA.

[00124] Até o ponto em que os métodos e composições da presente invenção encontram utilidade no contexto do "tratamento" de câncer, um tratamento é considerado "eficaz" se ele leva a um benefício clínico, tal como redução na expressão do gene de TOPK, diminuição no tamanho, prevalência ou potencial metastático do câncer em um indivíduo, retardo de progressão de câncer, alívio de um sintoma clínico de câncer, prolongamento do tempo de sobrevida, supressão de recor-

rência pós-operatória e assim por diante. Quando o tratamento é aplicado profilaticamente, "eficaz" significa que ele retarda ou previne a formação de cânceres ou previne ou alivia um sintoma clínico de câncer. A eficácia é determinada em associação com qualquer método conhecido para diagnóstico ou tratamento do tipo de tumor em particular.

[00125] Até o ponto em que os métodos e composições da presente invenção encontram utilidade no contexto da "prevenção" e "profilaxia" de câncer, tais termos são usado alternadamente aqui para referir-se à qualquer atividade que reduz a carga de mortalidade ou morbidez pela doença. Prevenção e profilaxia podem ocorrer "em níveis de prevenção primária, secundária e terciária". Embora prevenção e profilaxia primária evitem o desenvolvimento de uma doença, níveis de prevenção e profilaxia secundários e terciários abrangem atividades objetivadas à prevenção e profilaxia da progressão de uma doença e a emergência de sintomas, bem como redução do impacto negativo de uma doença já estabelecida ao restaurar a função e reduzindo complicações relacionadas à doença. Alternativamente, prevenção e profilaxia podem incluir uma ampla série de terapias profiláticas objetivadas a aliviar a gravidade do distúrbio em particular, por exemplo, reduzindo a proliferação e metástase de tumores.

[00126] No contexto da presente invenção, o tratamento e/ou profilaxia de câncer e/ou a prevenção de recorrência pós-operatória do mesmo incluem qualquer uma das etapas a seguir, tal como a remoção cirúrgica de células cancerosas, a inibição do crescimento de células cancerosas, a involução ou regressão de um tumor, a indução de remissão e supressão de ocorrência de câncer, a regressão de tumor e a redução ou inibição de metástase. Tratamento e/ou a profilaxia eficaz de câncer diminui a mortalidade e melhora o prognóstico de indivíduos que têm câncer, diminui os níveis de marcadores tumorais no

sangue e alivia os sintomas detectáveis que acompanham o câncer. Por exemplo, redução ou melhora de sintomas constitui tratamento eficaz e/ou a profilaxia inclui redução de 10%, 20%, 30% ou mais ou doença estável.

[00127] No contexto da presente invenção, o termo "anticorpo" refere-se à imunoglobulinas e fragmentos das mesmas que são especificamente reativos com uma proteína designada ou peptídeo da mesma. Um anticorpo pode incluir anticorpos humanos, anticorpos primatizados, anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos humanizados, anticorpos fundidos à outras proteínas ou radiomarcadores e fragmentos de anticorpos. Além disso, um anticorpo aqui é usado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada. Um "anticorpo" indica todas as classes (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

[00128] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme entendido comumente por aqueles versados na técnica ao qual a presente invenção pertence.

II. Peptídeos

[00129] Peptídeos da presente invenção, descritos em detalhes abaixo, podem ser referidos como "peptídeo(s) de TOPK" ou "polipeptídeo(s) de TOPK".

[00130] Para demonstrar que peptídeos derivados de TOPK funcionam como um antígeno reconhecido por CTLs, peptídeos derivados de TOPK (SEQ ID NO: 86) foram analisados para determinar se eles eram epítomos antigênicos restritos ao HLA-A24 ou HLA-A2 os quais são alelos de HLA comumente encontrados (Date Y *et al.*, *Tissue Anti-*

gens 47: 93-101 (1996); Kondo A *et al.*, *J. Immunol.* 155: 4307-12 (1995); Kubo R.T. *et al.*, *J. Immunol.* 152: 3913-24 (1994)).

[00131] Candidatos a peptídeos de ligação ao HLA-A24 derivados de TOPK identificados com base em suas afinidades de ligação ao HLA-A24 incluem:

[00132] TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-237 (SEQ ID NO: 4), TOPK-A24-9-155 (SEQ ID NO: 5), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-9-174 (SEQ ID NO: 7), TOPK-A24-9-73 (SEQ ID NO: 8), TOPK-A24-9-235 (SEQ ID NO: 9), TOPK-A24-9-19 (SEQ ID NO: 10), TOPK-A24-9-205 (SEQ ID NO: 11), TOPK-A24-9-77 (SEQ ID NO: 12), TOPK-A24-9-270 (SEQ ID NO: 13), TOPK-A24-9-58 (SEQ ID NO: 14), TOPK-A24-9-81 (SEQ ID NO: 15), TOPK-A24-9-278 (SEQ ID NO: 16), TOPK-A24-9-183 (SEQ ID NO: 17), TOPK-A24-9-227 (SEQ ID NO: 18), TOPK-A24-9-13 (SEQ ID NO: 19), TOPK-A24-9-146 (SEQ ID NO: 20), TOPK-A24-9-140 (SEQ ID NO: 21), TOPK-A24-9-103 (SEQ ID NO: 22), TOPK-A24-9-105 (SEQ ID NO: 23), TOPK-A24-9-118 (SEQ ID NO: 24), TOPK-A24-10-31 (SEQ ID NO: 25), TOPK-A24-10-155 (SEQ ID NO: 26), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27), TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28), TOPK-A24-10-130 (SEQ ID NO: 29), TOPK-A24-10-47 (SEQ ID NO: 30), TOPK-A24-10-73 (SEQ ID NO: 31), TOPK-A24-10-102 (SEQ ID NO: 32), TOPK-A24-10-39 (SEQ ID NO: 33), TOPK-A24-10-4 (SEQ ID NO: 34), TOPK-A24-10-77 (SEQ ID NO: 35), TOPK-A24-10-241 (SEQ ID NO: 36), TOPK-A24-10-12 (SEQ ID NO: 37), TOPK-A24-10-148 (SEQ ID NO: 38), TOPK-A24-10-145 (SEQ ID NO: 39) and TOPK-A24-10-114 (SEQ ID NO: 40).

[00133] Dos acima, os peptídeos a seguir resultaram no estabelecimento com sucesso de CTLs após estimulação *in vitro* de células T por células dendríticas (Dendritic Cells - DCs) carregadas com estes peptídeos: TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ

ID NO: 3), TOPK-A24-9- 232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-10- 288 (SEQ ID NO: 27) e TOPK-A24-10- 289 (SEQ ID NO: 28).

[00134] Candidatos a peptídeos que se ligam ao HLA-A2 derivados de TOPK identificados com base em suas atividades de ligação ao HLA-A2 incluem:

[00135] TOPK-A2-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A2-9-34 (SEQ ID NO: 43), TOPK-A2-9-236 (SEQ ID NO: 44), TOPK-A2-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A2-9-134 (SEQ ID NO: 46), TOPK-A2-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A2-9-81 (SEQ ID NO: 48), TOPK-A2-9-149 (SEQ ID NO: 49), TOPK-A2-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A2-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A2-9-227 (SEQ ID NO: 52), TOPK-A2-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A2-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A2-9-310 (SEQ ID NO: 55), TOPK-A2-9-132 (SEQ ID NO: 56), TOPK-A2-9-242 (SEQ ID NO: 57), TOPK-A2-9-156 (SEQ ID NO: 58), TOPK-A2-9-138 (SEQ ID NO: 59), TOPK-A2-9-142 (SEQ ID NO: 60), TOPK-A2-10-190 (SEQ ID NO: 61), TOPK-A2-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A2-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A2-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A2-10-234 (SEQ ID NO: 65), TOPK-A2-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A2-10-290 (SEQ ID NO: 67), TOPK-A2-10- 37 (SEQ ID NO: 68), TOPK-A2-10- 20 (SEQ ID NO: 69), TOPK-A2-10- 241 (SEQ ID NO: 70), TOPK-A2-10- 272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A2-10- 88 (SEQ ID NO: 72), TOPK-A2-10- 81 (SEQ ID NO: 73), TOPK-A2-10- 313 (SEQ ID NO: 74), TOPK-A2-10- 54 (SEQ ID NO: 75), TOPK-A2-10- 142 (SEQ ID NO: 76), TOPK-A2-10- 35 (SEQ ID NO: 77), TOPK-A2-10- 110 (SEQ ID NO: 78), TOPK-A2-10- 223 (SEQ ID NO: 79), TOPK-A2-10- 274 (SEQ ID NO: 80), TOPK-A2-10- 173 (SEQ ID NO: 81), TOPK-A2-10- 141 (SEQ ID NO: 82), TOPK-A2-10- 292 (SEQ ID NO: 83) and TOPK-A2-10-180 (SEQ ID NO: 84).

[00136] Dos acima, os peptídeos a seguir resultaram no estabelecimento com sucesso de CTLs após estimulação *in vitro* de células T

por células dendríticas (Dendritic Cells - DCs) carregadas com estes peptídeos: TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) and TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76).

[00137] Os CTLs estabelecidos mencionados acima mostraram atividade de CTL específica potente contra células alvo que receberam um pulso com os respectivos peptídeos. Estes resultados demonstram que TOPK é um antígeno reconhecido por um CTL e que os peptídeos são peptídeos epitópicos de TOPK restritos ao HLA-A24 ou HLA-A2; portanto, tais peptídeos podem ser eficazes como antígenos alvo para citotoxicidade por CTLs.

[00138] Uma vez que o gene de TOPK é superexpresso em células e tecidos cancerosos incluindo, por exemplo, aqueles de AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles e não expresso na maioria dos órgãos normais, ele representa um bom alvo para imunoterapia. Assim, a presente invenção fornece nonapeptídeos (peptídeos constituídos de nove resíduos de aminoácidos) e decapeptídeos (peptídeos constituídos de dez resíduos de aminoácidos) que correspondem a epítomos reconhecidos por CTL de TOPK. Exemplos particularmente preferidos de nonapeptídeos e decapeptídeos da presente invenção incluem aqueles peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2, 40 e 42 a 84.

[00139] Em geral, programas de software agora disponíveis, por exemplo, na Internet, tais como aqueles descritos em Parker, K.C. *et al.*, *J. Immunol.* 1994, 152(1): 163-75, e Nielsen, M. *et al.*, *Protein Sci* 2003; 12: 1007-17 podem ser usados para calcular as afinidades de ligação entre vários peptídeos e antígenos HLA *in silico*. A afinidade de ligação por antígenos HLA pode ser medida conforme descrito, por exemplo, em Parker, K.C. *et al.*, *J. Immunol.* 1994, 152(1): 163-75, Kuzushima, K. *et al.*, *Blood* 2001, 98(6): 1872-81, Larsen, M.V. *et al.* *BMC Bioinformatics*, 2007, 31; 8: 424, Buus, S, *et al.* *Tissue Antigens*, 62: 378-84, 2003, Nielsen, M. *et al.*, *Protein Sci.* 2003; 12: 1007-17; e Nielsen, M. *et al.* *PLoS ONE* 2007; 2: e796, os quais são resumidos, por exemplo, em Lafuente, E.M. *et al.*, *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15, 3209-3220. Métodos para determinação da afinidade de ligação são descritos, por exemplo, em *Journal of Immunological Methods* (1995, 185: 181-190) e *Protein Science* (2000, 9: 1838-1846). Portanto, pode-se utilizar prontamente tais programas de software para selecionar aqueles fragmentos derivados de TOPK que têm alta afinidade de ligação por antígenos HLA usando tais programas de software. Consequentemente, a presente invenção abrange peptídeos constituídos de quaisquer fragmentos derivados de TOPK, os quais poderiam ser determinados como se ligando a antígenos HLA por meio de tais programas conhecidos. Além disso, tais peptídeos podem incluir o peptídeo composto da sequência de comprimento total de TOPK.

[00140] Os peptídeos da presente invenção, particularmente os nonapeptídeos e decapeptídeos da presente invenção, podem ser flanqueados com resíduos de aminoácidos adicionais, contanto que o peptídeo resultante retenha sua capacidade de indução de CTL. Os resíduos de aminoácidos adicionais particulares podem ser constituídos de qualquer tipo de aminoácidos, contanto que eles não prejudiquem a

capacidade de indução de CTL do peptídeo original. Assim, a presente invenção abrange peptídeos que têm uma atividade de ligação a antígenos HLA, em particular peptídeos derivados de TOPK (por exemplo, peptídeos incluindo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 ou 76). Tais peptídeos têm, por exemplo, menos de cerca de 40 aminoácidos, frequentemente menos de cerca de 20 aminoácidos e, usualmente, menos de cerca de 15 aminoácidos.

[00141] Em geral, sabe-se que a modificação de um, dois ou mais aminoácidos em um peptídeo não influenciará a função do peptídeo e, em alguns casos, chegará mesmo a intensificar a função desejada da proteína original. De fato, peptídeos modificados (isto é, peptídeos constituídos de uma sequência de aminoácidos na qual 1, 2 ou vários resíduos de aminoácidos tenham sido modificados (isto é, substituídos, adicionados, deletados e/ou inseridos) quando comparado com uma sequência de referência original) são conhecidos por reter a atividade biológica do peptídeo original (Mark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81: 5662-6; Zoller e Smith, *Nucleic Acids Res.* 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79: 6409-13). Assim, em uma modalidade, os peptídeos da presente invenção tem capacidade de indução de CTL e uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84, na qual um, dois ou mesmo mais aminoácidos são adicionados, deletados, inseridos e/ou substituídos. Em outras palavras, os peptídeos da presente invenção têm tanto capacidade de indução de CTL e uma sequência de aminoácidos em que a, dois ou mais ácido (s) amino são substituídos, eliminados, inseridos e/ou substituídos. Em outras palavras, os peptídeos da presente invenção têm uma capacidade de indução de CTL e uma sequência de aminoácidos em que dois ou mais aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos e/ou adicionados

na sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 2 a 40 e 42 a 84, contanto que os peptídeos modificados retenham a capacidade de indução de CTL do peptídeo original.

[00142] Aqueles versados na técnica reconhecerão que modificações (isto é, deleções, inserções, adições e/ou substituições) em uma sequência de aminoácidos que alteram um único aminoácido ou uma pequena porcentagem da sequência de aminoácidos global tendem a resultar na conservação das propriedades da cadeia lateral de aminoácido original. Como tal, elas são, frequentemente, referidas como "substituições conservativas" ou "modificações conservativas", em que a alteração de uma proteína resulta em uma proteína modificada tendo uma função análoga à proteína original. Tabelas de substituição conservativa que fornecem aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica. Exemplos de características de cadeias laterais de aminoácidos que são desejáveis conservar incluem, por exemplo: aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) e cadeias laterais tendo os seguintes grupos funcionais ou características em comum: uma cadeia lateral alifática (G, A, V, L, I, P); uma cadeia lateral que contém grupo hidroxila (S, T, Y); uma cadeia lateral que contém átomo de enxofre (C, M); uma cadeia lateral que contém ácido carboxílico e amida (D, N, E, Q); uma cadeia lateral que contém base (R, K, H); e uma cadeia lateral que contém grupo aromático (H, F, Y, W). Além disso, os oito grupos a seguir contêm, cada um, aminoácidos que são aceitos na técnica como substituições conservativas uns dos outros:

Alanina (A), Glicina (G);

Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E);

Asparagina (N), Glutamina (Q);

Arginina (R), Lisina (K);

Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W);

Serina (S), Treonina (T); e

Cisteína (C), Metionina (M) (vide, por exemplo, Creighton, Proteins 1984).

[00143] Tais peptídeos conservativamente modificados também são considerados como sendo peptídeos da presente invenção. Entretanto, peptídeos da presente invenção não estão restritos aos mesmos e podem incluir modificações não conservativas, contanto que o peptídeo modificado resultante retenha a capacidade de indução de CTL do peptídeo original. Além disso, peptídeos modificados não deverão excluir peptídeos induzíveis por CTLs derivados de variantes polimórficas, homólogos entre espécies e alelos de TOPK.

[00144] Resíduos de aminoácidos podem ser inseridos, substituídos e/ou adicionados aos peptídeos da presente invenção ou, alternativamente, resíduos de aminoácidos podem ser deletados dos mesmos para obter uma maior afinidade de ligação. Para reter a capacidade de indução de CTL necessária, de preferência, se modifica (isto é, deleta, insere, adiciona e/ou substitui) apenas um pequeno número (por exemplo, 1, 2 ou vários) ou uma pequena porcentagem de aminoácidos. Aqui, o termo "vários" significa 5 ou menos aminoácidos, por exemplo, 4 ou 3 ou menos. A porcentagem de aminoácidos a ser modificada é, de preferência, 20% ou menos, mais preferivelmente 15% ou menos e, ainda mais preferivelmente, 10% ou menos, por exemplo, 1 a 5%.

[00145] Quando usados no contexto de imunoterapia, os peptídeos da presente invenção deverão ser apresentados sobre a superfície de uma célula ou exossoma, de preferência como um complexo com um antígeno HLA. Portanto, é preferível selecionar peptídeos que não apenas induzem a CTLs, mas também possuem alta afinidade de ligação ao antígeno HLA. Para esta finalidade, os peptídeos podem ser

modificados por meio de substituição, inserção, deleção e/ou adição dos resíduos de aminoácido para proporcionar um peptídeo modificado tendo afinidade de ligação aprimorada. Além dos peptídeos que são apresentados naturalmente, uma vez que a regularidade das sequências de peptídeos apresentados por ligação a antígenos HLA já é conhecida (*J. Immunol.* 1994, 152: 3913; *Immunogenetics* 1995, 41: 178; *J. Immunol.* 1994, 155: 4307), modificações com base em tal regularidade podem ser introduzidas nos peptídeos imunogênicos da invenção.

[00146] Por exemplo, peptídeos que possuem alta afinidade de ligação ao HLA-A24 tendem a ter o segundo aminoácido a partir do N-término substituído por fenilalanina, tirosina, metionina ou triptofano. Similarmente, peptídeos nos quais o aminoácido C-terminal é substituído por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano ou metionina tendem a ter alta afinidade de ligação pelo HLA-A24. Consequentemente, pode ser desejável substituir o segundo aminoácido a partir do N-término por fenilalanina, tirosina, metionina ou triptofano e/ou o aminoácido no C-término por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano ou metionina a fim de aumentar a afinidade de ligação ao HLA-A24. Assim, peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 (especialmente SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28), na qual o segundo aminoácido a partir do N-término da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: é substituído por fenilalanina, tirosina, metionina ou triptofano e/ou na qual o C-término da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: é substituído por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano ou metionina são abrangidos pela presente invenção. Também, a presente invenção abrange os peptídeos incluindo uma sequência de aminoácidos em que um, dois ou vários aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos e/ou adicionados na sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 e 40 (especialmente SEQ ID

NOs: 2, 3, 6, 27 e 28), tais peptídeos tendo uma ou ambas das características a seguir: (a) o segundo aminoácido do N-término é fenilalanina, tirosina, metionina ou triptofano; e (b) o aminoácido C-terminal é fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano ou metionina. Em modalidades preferidas, os peptídeos da presente invenção incluem uma sequência de aminoácidos na qual o segundo aminoácido a partir do N-término é substituído por fenilalanina, tirosina, metionina ou triptofano e/ou o aminoácido C-terminal é substituído por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano ou metionina na sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 2 a 40 (especialmente SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 27 e 28).

[00147] Similarmente, peptídeos que mostram alta afinidade de ligação ao HLA-A2 tendem a ter o segundo aminoácido a partir do N-término substituído por leucina ou metionina e/ou o aminoácido no C-término substituído por valina ou leucina. Alternativamente, pode ser desejável substituir o segundo aminoácido a partir do N-término por leucina ou metionina e/ou o aminoácido no C-término por valina ou leucina a fim de aumentar a afinidade de ligação ao HLA-A2. Assim, peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NOS: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76), na qual o segundo aminoácido a partir do N-término da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO é substituído por leucina ou metionina e/ou na qual o C-término da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO é substituído por valina ou leucina são abrangidos pela presente invenção. Também, a presente invenção abrange os peptídeos incluindo uma sequência de aminoácidos em que um, dois ou vários aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos e/ou adicionados na sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NOS: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76), tais peptídeos tendo

uma ou ambas das características a seguir: (a) o segundo aminoácido do N-término é leucina ou metionina; e (b) o aminoácido C-terminal é valina ou leucina. Em modalidades preferidas, os peptídeos da presente invenção incluem uma sequência de aminoácidos na qual o segundo aminoácido a partir do N-término é substituído por leucina ou metionina e/ou o aminoácido C-terminal é substituído por valina ou leucina na sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS SEQ ID NOs: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76).

[00148] Substituições podem ser introduzidas não apenas nos aminoácidos terminais, mas também na posição de reconhecimento potencial de receptor de células T (T Cell Receptor - TCR) de peptídeos. Vários estudos demonstraram que um peptídeo com substituições de aminoácidos pode ser igual ou melhor o original, por exemplo, CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ ou gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba *et al. Cancer Res.* 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann *et al. J. Immunol.* 2002; 168(3): 1338-47., S. O. Dionne *et al. Cancer Immunol. immunother.* (2003) 52: 199-206 e S. O. Dionne *et al. Cancer Immunology, Immunotherapy* (2004) 53, 307-314).

[00149] A presente invenção também abrange a adição de 1, 2 ou vários aminoácidos podem também ser adicionados ao N- e/ou C-término dos presentes peptídeos. Tais peptídeos modificados que têm capacidade de indução CTL também são incluídos na presente invenção.

[00150] Por exemplo, a presente invenção fornece um peptídeo isolado de menos de 15, 14, 13, 12, 11 ou 10 aminoácidos de comprimento, o qual tem capacidade de indução de CTL e compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

[00151] uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 to 24 and 42 to 60,

[00152] uma sequência de aminoácidos na qual 1, 2 ou vários ami-

noácidos são modificados na sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 a 24 e 42 a 60, em que o peptídeo tem uma capacidade de induzir a um linfócito T citotóxico,

[00153] a sequência de aminoácidos de (ii) em que, no contexto de HLA-A24, a sequência de aminoácidos tem uma ou ambas das seguintes características:

[00154] o segundo aminoácido a partir do N-término das referidas SEQ ID NOs é ou é modificado para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em fenilalanina, tirosina, metionina e triptofano, e

[00155] o aminoácido C-terminal das referidas SEQ ID NOs é ou é modificado para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano e metionina, e

[00156] a sequência de aminoácidos de (ii) em que, no contexto de HLA-A2, a sequência de aminoácidos tem uma ou ambas das seguintes características:

[00157] (c) o segundo aminoácido a partir do N-término da referida SEQ ID NO é selecionado do grupo que consiste em leucina ou metionina; e

[00158] (d) o aminoácido C-terminal da referida SEQ ID NO é selecionado do grupo que consiste em valina ou leucina.

[00159] Além disso, a presente invenção fornece também um peptídeo isolado de menos de 15, 14, 13, 12 ou 11 aminoácidos de comprimento o qual tem capacidade de indução de CTL e compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

[00160] (i') uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 25 a 40 e 61 a 84,

[00161] (ii') uma sequência de aminoácidos na qual 1, 2 ou vários aminoácidos são modificados na sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 25 a 40 e 61 a 84, em que o peptídeo tem uma capacidade de induzir a um linfócito T citotó-

xico,

[00162] (iii') a sequência de aminoácidos de (i') em que, no contexto de HLA-A24, a sequência de aminoácidos tem uma ou ambas das características a seguir:

[00163] (a') o segundo aminoácido a partir do N-término da referida SEQ ID NO é modificado para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em fenilalanina, tirosina, metionina e triptofano, e

[00164] (b') o aminoácido C-terminal das referidas SEQ ID NOs é ou é modificado para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano e metionina,

[00165] (iv') a sequência de aminoácidos de (ii') em que, no contexto de HLA-A2, a sequência de aminoácidos tem uma ou ambas das seguintes características:

[00166] (c') o segundo aminoácido a partir do N-término das referidas SEQ ID NOs é ou é modificado para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em leucina e metionina; e

[00167] (d') o aminoácido C-terminal das referidas SEQ ID NOs é ou é modificado para ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em valina e leucina.

[00168] Estes peptídeos se ligam com antígenos HLA em APCs a serem apresentados sobre APCs como complexo com um antígeno HLA quando esses peptídeos são contatados com APCs. Alternativamente, estes peptídeos são introduzidos em APCs e processados em fragmentos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre (i)-(iv) e (i')-(iv') em APCs a serem apresentadas sobre APCs como complexos com antígenos HLA quando estes peptídeos são contatados com APCs. Consequentemente, CTL específicos a tais peptídeos são induzidos.

[00169] Entretanto, quando a sequência peptídica é idêntica a uma parte da sequência de aminoácidos de uma proteína endógena ou

exógena que tem uma função diferente, efeitos colaterais negativos, tais como distúrbios autoimunes e/ou sintomas alérgicos contra substâncias específicas, podem ser induzidos. Portanto, pode ser desejável primeiro realizar buscas por homologia usando bancos de dados disponíveis para evitar situações nas quais a sequência do peptídeo equivale à sequência de aminoácidos de outra proteína. Quando se torna evidente, a partir das buscas por homologia, que não existe peptídeo idêntico ou tendo 1 ou 2 diferenças de aminoácidos quando comparado com o peptídeo alvo na natureza, o peptídeo alvo pode ser modificado de forma a aumentar sua afinidade de ligação por antígenos HLA e/ou aumentar sua capacidade de indução de CTL sem qualquer perigo de tais efeitos colaterais.

[00170] Embora se espere que peptídeos que têm alta afinidade de ligação aos antígenos HLA, conforme descrito acima, sejam altamente eficazes, os peptídeos candidatos, os quais são selecionados de acordo com a presença de alta afinidade de ligação como um indicador, são adicionalmente examinados quanto à presença de capacidade de indução de CTL. Aqui, a frase "capacidade de indução de CTL" indica a capacidade do peptídeo de induzir a linfócitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocytes - CTLs) quando apresentado sobre células que apresentam de antígeno (Antigen-Presenting Cells - APCs). Ainda, "capacidade de indução de CTL" inclui a capacidade do peptídeo de induzir à ativação de CTL, proliferação de CTL, promover a lise de células alvo por CTL e aumentar a produção de IFN-gama por CTL.

[00171] Confirmação da capacidade de indução de CTL é realizada induzindo APCs que trazem antígenos MHC humanos (por exemplo, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (Dendritic Cells - DCs)) ou, mais especificamente, DCs derivadas de leucócitos mononucleares de sangue periférico humano e, após estimulação de APCs com um peptídeo de teste, misturando APCs com células T CD8 positivas

para induzir a CTLs e, então, medindo-se o IFN-gama produzido e liberado por CTL contra as células alvo. Como o sistema da reação, animais transgênicos que tenham sido produzidos para expressar um antígeno HLA humano (por exemplo, aqueles descritos em BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL Response by a Minimal Epitope Vaccine in HLA A*0201/DR1 Transgenic Mice: Dependence on MHC (HLA) Class II Restricted T(H) Response), podem ser usados. Alternativamente, as células alvo podem ser radiomarcadas com ^{51}Cr e similares e a atividade citotóxica de CTL pode ser calculada a partir da radioatividade liberada das células alvo. Alternativamente, a capacidade de indução de CTL pode ser ensaiada medindo-se o IFN-gama produzido e liberado por CTL na presença de APCs que trazem peptídeos imobilizados e visualizando a zona de inibição sobre o meio usando anticorpos monoclonais anti-IFN-gama.

[00172] Como um resultado de exame da capacidade de indução de CTL dos peptídeos conforme descrito acima, descobriu-se que nonapeptídeos ou decapeptídeos selecionados dentre as sequências de aminoácidos indicadas por SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 mostraram capacidade de indução de CTL particularmente alta, bem como alta afinidade de ligação a um antígeno HLA. Assim, estes peptídeos são exemplificados como modalidades preferidas da presente invenção.

[00173] Além disso, resultados da análise por homologia demonstraram que tais peptídeos não têm homologia significativa com peptídeos derivados de quaisquer outros produtos gênicos humanos conhecidos. Consequentemente, a possibilidade de respostas imunes desconhecidas ou indesejadas surgirem quando usados para imunoterapia é reduzida. Portanto, também a partir deste aspecto, estes peptí-

deos são úteis para estimular imunidade contra TOPK em pacientes com câncer. Assim, exemplos preferidos dos peptídeos da presente invenção incluem, porém sem limitações, peptídeos que têm uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 e peptídeos modificados dos mesmos.

[00174] Conforme observado acima, os peptídeos da presente invenção tem uma capacidade de induzir a CTL específicos para TOPK. Por exemplo, os peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28 ou peptídeos modificados dos mesmos têm uma capacidade de induzir a um CTL que pode mostrar a atividade citotóxica específica contra uma célula que apresenta um peptídeo derivado de TOPK via HLA-A24 (por exemplo, células que expressam TOPK e HLA-A24). Exemplos de tais células incluem células cancerosas positivas para HLA-A24. Do mesmo modo, os peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 ou peptídeos modificados dos mesmos têm uma capacidade de induzir a um CTL que pode mostrar atividade citotóxica específica contra uma célula que apresenta um peptídeo derivado de TOPK via HLA-A2 (por exemplo, células que expressam TOPK e HLA-A2). Exemplos de tais células incluem células cancerosas positivas para HLA-A2.

[00175] Além das modificações descritas acima, os peptídeos da presente invenção podem também ser ligados a outros peptídeos, contanto que o peptídeo ligado resultante retenha a capacidade de indução de CTL requerida do peptídeo original e, mais preferivelmente, também retenha a capacidade de ligação ao HLA requerida. Exemplos de "outros" peptídeos adequados incluem: os peptídeos da presente invenção ou os peptídeos induzíveis por CTL derivados de outros TAAs. O peptídeo da presente invenção pode ser ligado 4a "outro"

peptídeo via um ligante direta ou indiretamente. Ligantes inter-peptídeo adequados são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, AAY (P. M. Daftarian *et al.*, J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller *et al.*, J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) ou K (S. Ota *et al.*, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura *et al.*, J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

[00176] Por exemplo, peptídeos antigênicos associados a tumor diferentes de TOPK também podem ser usados subsequente ou simultaneamente para aumentar a resposta imune via a classe I e/ou classe II do HLA. É bem estabelecido que as células cancerosas podem expressar mais de um gene associado a tumor. Assim, está dentro do âmbito da experimentação de rotina para aqueles versados na técnica determinar se um indivíduo em particular expressa genes associados a tumor adicionais e, então, incluir peptídeos de ligação à classe I do HLA e/ou classe II do HLA derivados de tais produto gênicos nas composições farmacêuticas ou vacinas da presente invenção.

[00177] Alguns peptídeos que se ligam à classe I do HLA e classe II do HLA são conhecidos por aqueles versados na técnica (por exemplo, vide Coulie, *Stem Cells* 13: 393-403, 1995) e podem ser usados na presente invenção de uma maneira similar àquela aqui descrita. Assim, aqueles versados na técnica podem preparar prontamente polipeptídeos que incluem um ou mais peptídeos de TOPK e um ou mais dos peptídeos diferentes de TOPK ou ácidos nucleicos que codificam tais polipeptídeos, usando procedimentos padrões de biologia molecular.

[00178] Os peptídeos ligados descritos acima são aqui referidos como "politopos", isto é, grupos de dois ou mais peptídeos de estimulação de resposta imune ou potencialmente imunogênicos os quais podem ser unidos juntos em vários arranjos (por exemplo, concatenados, sobrepostos). O politopo (ou ácido nucleico que codifica o polito-

po) pode ser administrado em um protocolo padrão de imunização, por exemplo, a animais, para testar a eficácia do politopo em estimular, intensificar e/ou provocar uma resposta imune.

[00179] Os peptídeos podem ser unidos juntos diretamente ou via o uso de sequências de flanqueamento para formar politopos e o uso de politopos como vacinas é bem conhecido na técnica (vide, por exemplo, Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92(13): 5845-5849, 1995; Gilbert *et al.*, *Nature Biotechnol.* 15(12): 1280-1284, 1997; Thomson *et al.*, *J Immunol.* 157(2): 822-826, 1996; Tarn *et al.*, *J Exp. Med.* 171(1): 299-306, 1990). Politopos que contêm vários números e combinações de epítomos podem ser preparados e testados quanto ao reconhecimento por CTLs e quanto à eficácia em aumentar uma resposta imune.

[00180] Os peptídeos da presente invenção podem também ser ligados a outras substâncias, contanto que o peptídeo ligado resultante retenha a capacidade de indução de CTL requerida do peptídeo original. Exemplos de substâncias adequadas podem incluir, por exemplo: peptídeos, lipídios, açúcar e cadeias de açúcar, grupos acetila, polímeros naturais e sintéticos, etc. Os peptídeos podem conter modificações tais como glicosilação, oxidação ou fosforilação de cadeia lateral, etc., contanto que as modificações não destruam a atividade biológica do peptídeo original. Estes tipos de modificações podem ser realizadas para conferir funções adicionais (por exemplo, função de objetivação e função de distribuição) ou para estabilizar o peptídeo.

[00181] Por exemplo, para aumentar a estabilidade *in vivo* de um peptídeo, é conhecido na técnica introduzir D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos ou aminoácidos não naturais; este conceito pode também ser adaptado aos presentes peptídeos. A estabilidade de um peptídeo pode ser ensaiada de inúmeras maneiras. Por exemplo, peptidases e vários meios biológicos, tais como plasma e soro humano, po-

dem ser usados para testar a estabilidade (vide, por exemplo, Verhoef *et al.*, *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 1986, 11: 291-302).

[00182] Além disso, conforme mencionado acima, dentre os peptídeos modificados que são substituídos, deletados, inseridos ou adicionados em 1, 2 ou vários resíduos de aminoácidos, aqueles que têm a mesma ou uma maior atividade quando comparado com os peptídeos originais podem sofrer triagem ou ser selecionados. A presente invenção, portanto, fornece também o método de triagem ou seleção de peptídeos modificados que têm a mesma ou uma maior atividade quando comparado com os originais. Um método ilustrativo inclui as etapas de:

[00183] a: modificação (isto é, substituição, deleção, inserção ou adição de pelo menos um resíduo de aminoácido de um peptídeo da presente invenção,

[00184] b: determinação da atividade do peptídeo,

[00185] c: seleção do peptídeo tendo a mesma ou atividade maior quando comparado com o original.

[00186] Em modalidades preferidas, a presente invenção proporciona um método de triagem de um peptídeo tendo uma capacidade de induzir a um CTL que tem atividade citotóxica específica contra uma célula que apresenta um fragmento derivado de TOPK, em que o método compreende as etapas de:

[00187] fornecimento de uma sequência candidata que consiste em uma sequência de aminoácidos modificada por substituição, deleção, inserção e/ou adição de um, dois ou vários resíduos de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos original, em que a sequência de aminoácido original é selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76;

[00188] seleção de uma sequência candidata que não têm homolo-

gia (ou identidade de sequência) significativa substancial com os peptídeos derivados de quaisquer outros produtos gênicos humanos conhecidos que não TOPK;

[00189] contato de um peptídeo que consiste na sequência candidata selecionado na etapa (iii) com uma célula que apresenta antígeno;

[00190] contato da célula que apresenta antígeno da etapa (c) com uma célula T CD8 positiva; e

[00191] identificação do peptídeo cuja capacidade de indução de CTL é a mesma ou maior do que um peptídeo que consiste na sequência de aminoácidos original.

[00192] Aqui, a atividade a ser ensaiada pode incluir atividade de ligação ao MHC, capacidade de indução de APC ou CTL e atividade citotóxica. De preferência, a atividade do peptídeo a ser ensaiada é capacidade de indução de CTL.

III. Preparo de Peptídeos de TOPK

[00193] Os peptídeos da presente invenção podem ser preparados usando técnicas bem conhecidas. Por exemplo, os peptídeos podem ser preparados sinteticamente, usando tecnologia de DNA recombinante ou síntese química. Os peptídeos da presente invenção podem ser sintetizados individualmente ou como polipeptídeos mais longos que incluem dois ou mais peptídeos. Os peptídeos podem, então, ser isolados, isto é, purificados ou isolados de modo a serem substancialmente livres de outras proteínas de célula hospedeira que ocorrem naturalmente e fragmentos das mesmas ou quaisquer outras substâncias químicas.

[00194] Os peptídeos da presente invenção podem conter modificações, tais como glicosilação, oxidação de cadeia lateral ou fosforilação, contanto que as modificações não destruam a atividade biológica do peptídeo original. Outras modificações ilustrativas incluem incorpo-

ração de um ou mais D-aminoácidos ou outros miméticos de aminoácidos que podem ser usados, por exemplo, para aumentar a meia-vida sérica dos peptídeos.

[00195] Peptídeos da presente invenção podem ser obtidos através de síntese química com base na sequência de aminoácidos selecionada. Exemplos de métodos de síntese peptídica convencionais que podem ser adaptados para a síntese incluem:

[00196] "Peptide Synthesis", Interscience, New York, 1966;

[00197] "The Proteins, Vol. 2", Academic Press, New York, 1976;

[00198] "Peptide Synthesis" (em japonês), Maruzen Co., 1975;

[00199] "Basics and Experiment of Peptide Synthesis (em japonês), Maruzen Co., 1985;

[00200] "Development of Pharmaceuticals" (segundo volume) (em japonês), Volume 14 (Peptide Synthesis), Hirokawa, 1991;

[00201] documento nº WO 99/67288; e

[00202] Barany G. & Merrifield R.B., "Peptide Vol. 2", "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

[00203] Alternativamente, os presentes peptídeos podem ser obtidos adaptando qualquer método de engenharia genética conhecido para produção de peptídeos (por exemplo, Morrison J, *J Bacteriology* 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, "Methods in Enzymology" (editores Wu *et al.*) 1983, 101: 347-62). Por exemplo, primeiramente, um vetor apropriado que aloja um polinucleotídeo que codifica o peptídeo alvo em uma forma passível de expressão (por exemplo, a jusante de uma sequência reguladora que corresponde a uma sequência promotora) é preparado e transformado em uma célula hospedeira apropriada. A célula hospedeira é, então, cultivada para produzir o peptídeo de interesse. O peptídeo pode ser produzido também *in vitro* adotando um sistema de tradução *in vitro*.

IV. Polinucleotídeos

[00204] A presente invenção também fornece um polinucleotídeo que codifica qualquer um dos peptídeos da presente invenção antes mencionados. Estes incluem polinucleotídeos derivados do gene de TOPK que ocorre naturalmente (por exemplo, N° de Acesso ao Gen-Bank NM_018492 (por exemplo, SEQ ID NO: 85)), bem como aqueles que têm uma sequência de nucleotídeos conservativamente modificada do mesmo. Aqui, a frase "sequência de nucleotídeos conservativamente modificada" refere-se à sequências as quais codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas. Em virtude da degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codificam qualquer dada proteína. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU codificam todos o aminoácido alanina. Assim, em cada posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para qualquer um dos códons correspondentes descritos sem alteração do polipeptídeo codificado. Tais variações de ácidos nucleicos são "variações silenciosas", as quais são uma espécie de variações conservativamente modificadas. Cada sequência de ácidos nucleicos aqui a qual codifica um peptídeo descreve também cada possível variação silenciosa do ácido nucleico. Aqueles versados na técnica reconhecerão que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, o qual é comumente o único códon para metionina, e TGG, o qual é comumente o único códon para triptofano) pode ser modificado para proporcionar uma molécula funcionalmente idêntica. Consequentemente, cada variação silenciosa de um ácido nucleico que codifica um peptídeo está implicitamente descrita em cada sequência descrita.

[00205] O polinucleotídeo da presente invenção pode ser constituído de DNA, RNA e derivados dos mesmos. Conforme é bem conhecido na técnica, um DNA é adequadamente constituído de bases, tais como A, T, C e G e T é substituído por U em um RNA. Aqueles versa-

dos na técnica reconhecerão que bases que não ocorrem naturalmente podem ser também incluídas em polinucleotídeos.

[00206] O polinucleotídeo da presente invenção pode codificar múltiplos peptídeos da presente invenção com ou sem sequências de aminoácidos intervenientes entre os mesmos. Por exemplo, as sequências de aminoácidos intervenientes podem proporcionar um sítio de clivagem (por exemplo, sequência de reconhecimento de enzima) do polinucleotídeo ou dos peptídeos traduzidos. Além disso, o polinucleotídeo pode incluir quaisquer sequências adicionais à sequência de codificação que codifica o peptídeo da presente invenção. Por exemplo, o polinucleotídeo pode ser um polinucleotídeo recombinante que inclui sequências reguladoras necessárias para a expressão do peptídeo ou pode ser um vetor de expressão (plasmídeo) com genes marcadores e similares. Em geral, tais polinucleotídeos recombinantes podem ser preparados por meio da manipulação de polinucleotídeos através de técnicas recombinantes convencionais usando, por exemplo, polimerases e endonucleases.

[00207] Técnicas recombinantes e de síntese química podem ser usadas para produzir os polinucleotídeos da presente invenção. Por exemplo, um polinucleotídeo pode ser produzido mediante inserção em um vetor apropriado, o qual pode ser expresso quando transfectado em uma célula competente. Alternativamente, um polinucleotídeo pode ser amplificado usando técnicas de PCR ou expressão em hospedeiros adequados (vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). Alternativamente, um polinucleotídeo pode ser sintetizado usando as técnicas em fase sólida, conforme descrito em Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311; Matthes *et al.*, *EMBO J* 1984, 3: 801-5.

V. Exossomos

[00208] A presente invenção fornece ainda vesículas intracelulares denominadas exossomos que apresentam complexos formados entre os peptídeos da presente invenção e antígenos HLA sobre sua superfície. Os exossomos podem ser preparados, por exemplo, usando os métodos detalhados no Pedido de Patente Japonesa, Kohyo Publications N^{os} Hei 11-510507 e documento WO 99/03499, e podem ser preparados usando APCs obtidas a partir de pacientes que estão sendo submetidos a tratamento e/ou prevenção. Os exossomos da presente invenção podem ser inoculados como vacinas, de um modo similar aos peptídeos da presente invenção.

[00209] O tipo de antígenos HLA incluídos nos complexos deve equivaler àquele do indivíduo que requer tratamento e/ou prevenção. Por exemplo, na população Japonesa, HLA-A24 e HLA-A2, particularmente HLA-A*2402 e HLA-A*0201 e HLA-A*0206, são prevalentes e, portanto, seriam apropriados para tratamento de pacientes Japoneses. O uso do tipo HLA-A24 que é altamente expresso entre Japoneses e Caucasianos é favorável para obtenção de resultados eficazes e subtipos tais como HLA-A*2402, HLA-A*0201 e HLA-A*0206, também encontram uso. Tipicamente, na clínica, o tipo de antígeno HLA do paciente que requer tratamento é investigado antecipadamente, o qual permite a seleção apropriada de peptídeos que têm altos níveis de afinidade de ligação pelo antígeno em particular ou que têm a capacidade de indução de CTL mediante apresentação de antígeno. Além disso, de forma a obter peptídeos tendo alta afinidade de ligação e capacidade de indução de CTL, substituição, inserção, deleção e/ou adição de 1, 2 ou vários aminoácidos pode ser realizada com base na sequência de aminoácidos do peptídeo parcial de TOPK que ocorre naturalmente.

[00210] Quando o exossomo da presente invenção possui o tipo HLA-A24 como um antígeno, os peptídeos incluindo a sequência de

aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 (especialmente SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28) têm utilidade particular.

[00211] Alternativamente, quando o exossomo da presente invenção possui o tipo HLA-A2 como um antígeno, os peptídeos incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76) têm utilidade particular.

[00212] Em algumas modalidades, os exossomos da presente invenção são exossomos que apresentam um complexo do peptídeo da presente invenção e antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 sobre sua superfície. Em modalidades típicas, o exossomo da presente invenção apresenta um complexo de um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 ou 28 (ou um peptídeo modificado do mesmo) e HLA-A24 sobre sua superfície. Em outras modalidades, o exossomo da presente invenção apresenta um complexo de um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 ou 76 (ou um peptídeo modificado do mesmo) e HLA-A2 sobre sua superfície.

VI. Células que Apresentam Antígenos (Antigen-Presenting Cells - APCs)

[00213] A presente invenção fornece também células que apresentam antígeno (Antigen-Presenting Cells - APCs) isoladas que apresentam complexos formados entre antígenos HLA e os peptídeos da presente invenção sobre sua superfície. As APCs podem ser derivadas de pacientes que estão sendo submetidos a tratamento e/ou prevenção e podem ser administradas como vacinas em si ou em combinação com outros fármacos que incluem os peptídeos, exossomos ou CTLs da presente invenção.

[00214] As APCs não estão limitadas a um tipo particular de célula. Exemplos de APCs incluem, porém sem limitações, células dendríticas

(Dendritic Cells - DCs), células de Langerhans, macrófagos, células B e células T ativadas, as quais são conhecidas por apresentar antígenos proteínicos sobre sua superfície celular, de modo a serem reconhecidas por linfócitos. Uma vez que DCs são APCs representativas que têm atividade de indução de CTL mais forte dentre as APCs, DCs podem ser, de preferência, usadas como as APCs da presente invenção.

[00215] Por exemplo, as APCs da presente invenção podem ser obtidas por meio de indução de DCs de monócitos de sangue periférico e, então, colocando-as em contato (estimulando) com os peptídeos da presente invenção *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Quando os peptídeos da presente invenção são administrados aos indivíduos, APCs que apresentam os peptídeos da presente invenção são induzidas no corpo do indivíduo. Aqui, a frase "indução de uma APC" inclui contato (estimulação) de uma célula que apresenta antígeno com os peptídeos da presente invenção ou introdução de um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção em uma célula que apresenta antígeno para ter o APC presente como um complexo formado entre um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície. Por exemplo, as APCs da presente invenção podem ser obtidas coletando APCs de um indivíduo após administração de um ou mais peptídeos da presente invenção ao indivíduo. Alternativamente, as APCs da presente invenção podem ser obtidas contatando as APCs as quais foram coletadas de um indivíduo com o peptídeo da presente invenção.

[00216] As APCs da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo para indução de uma resposta imune contra câncer no indivíduo em si ou em combinação com outros fármacos que incluem os peptídeos, exossomos ou CTLs da presente invenção. Por exemplo, a administração *ex vivo* pode incluir as etapas de:

[00217] a: coleta de APCs de um primeiro indivíduo,

- [00218] b: contato das APCs da etapa a com o peptídeo, e
- [00219] c: administração das APCs da etapa b a um segundo indivíduo.
- [00220] O primeiro indivíduo e o segundo indivíduo podem ser os mesmos indivíduos ou podem ser indivíduos diferentes.
- [00221] As APCs obtidas pela etapa b podem ser formuladas e administradas como uma vacina para tratamento e/ou prevenção de câncer, tais como câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer esofageal, câncer gástrico, câncer gástrico do tipo difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de próstata, SCLC, tumor de tecidos moles e tumor testicular, mas não limitados aos mesmos.
- [00222] No contexto da presente invenção, pode-se utilizar um ou mais peptídeos da presente invenção para fabricação de uma composição farmacêutica para induzir a uma célula que apresenta antígeno. Um método ou processo para a fabricação de uma composição farmacêutica para induzir a uma célula que apresenta antígeno é fornecido aqui e inclui, de preferência, a etapa de mistura ou formulação do peptídeo da invenção com um veículo farmaceuticamente aceitável.
- [00223] A presente invenção também permite o uso do peptídeo da presente invenção para indução de uma célula que apresenta antígeno. De acordo com um aspecto da presente invenção, as APCs da presente invenção têm capacidade de indução de CTL. No contexto das APCs, a frase "capacidade de indução de CTL", se refere à capacidade de uma APC de induzir a um CTL quando em contato com uma célula T CD8 positiva. Além disso, a "capacidade de indução de CTL" inclui a capacidade de uma APC de induzir à ativação de CTL, proliferação de CTL, promover a lise de uma célula alvo por um CTL e aumentar a produção de IFN-gama por um CTL. Em particular, as APCs

da presente invenção têm uma capacidade de induzir a CTL específicos para TOPK.

[00224] Tais APCs tendo capacidade de indução de CTL podem ser preparadas por meio de um método que inclui a etapa de transferência de um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção para APCs *in vitro*, bem como o método mencionado acima. Os polinucleotídeos introduzidos podem estar na forma de DNAs ou RNAs. Exemplos de métodos para introdução incluem, sem limitações específicas, vários métodos realizados convencionalmente neste campo, tais como lipofecção, eletroporação e o método com fosfato de cálcio pode ser usado. Mais especificamente, ela pode ser realizada conforme descrito em *Cancer Res* 1996, 56: 5672-7; *J Immunol* 1998, 161: 5607-13; *J Exp Med* 1996, 184: 465-72; Tradução Japonesa Publicada da Publicação Internacional Nº 2000-509281. Transferindo o gene que codifica o peptídeo da presente invenção para APCs, o gene sofre transcrição, tradução e similares na célula e, então, a proteína obtida é processada pela Classe I ou Classe II do MHC e prossegue através de uma via de apresentação para apresentar os peptídeos da presente invenção. Alternativamente, as APCs da presente invenção podem ser preparadas por meio de um método o qual inclui a etapa de contato de APCs com o peptídeo da presente invenção.

[00225] Em algumas modalidades, as APCs da presente invenção são APCs que apresentam complexos de antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 e o peptídeo da presente invenção sobre sua superfície. Em modalidades típicas, a APC da presente invenção apresenta um complexo de um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 ou 28 (ou um peptídeo modificado do mesmo) e HLA-A24 sobre sua superfície. Em outras modalidades, a APC da presente invenção apresenta um complexo de um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64,

66, 71, 72 ou 76 (ou um peptídeo modificado do mesmo) e HLA-A2 sobre sua superfície.

VII. Linfócitos T Citotóxicos (Cytotoxic T lymphocytes - CTLs)

[00226] Um CTL induzido contra qualquer um dos peptídeos da presente invenção fortalece a resposta imune que objetiva células cancerosas *in vivo* e, assim, pode ser usado como vacinas, de um modo similar aos peptídeos *per se*. Assim, a presente invenção fornece CTLs isolados que são especificamente induzidos ou ativados por qualquer um dos peptídeos da presente invenção.

[00227] Tais CTLs podem ser obtidos por meio de (1) administração do(s) peptídeo(s) da presente invenção a um indivíduo ou (2) contato (estimulação) de APCs derivadas do indivíduo e células T CD8 positivas ou leucócitos mononucleares de sangue periférico *in vitro* com o(s) peptídeo(s) da presente invenção ou (3) contato de células T CD8 positivas ou leucócitos mononucleares de sangue periférico *in vitro* com as APCs ou exossomos que apresentam um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção sobre sua superfície ou (4) introdução de um polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam subunidades de receptor de células T (T Cell Receptor - TCR) que podem formar um TCR tendo uma capacidade de se ligar a um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção sobre uma superfície celular. Tais APCs ou exossomos para o método de (3) podem ser preparados por meio dos métodos descritos acima. Detalhes do método de (4) estão descritos abaixo na seção "VIII. Receptor de Células T (T Cell Receptor - TCR)".

[00228] Os CTLs da presente invenção podem ser derivados de pacientes que são submetidos a tratamento e/ou prevenção e podem ser administrados em si ou em combinação com outros fármacos que incluem os peptídeos, APCs ou exossomos para fins de regulação de efeitos. Os CTLs obtidos atuam especificamente contra células alvo

que apresentam os peptídeos da presente invenção, por exemplo, os mesmos peptídeos usados para indução. As células alvo podem ser células que expressam de forma endógena TOPK, tais como células cancerosas ou células que são transfectadas com o gene de TOPK; e células que apresentam um peptídeo da presente invenção sobre a superfície celular em virtude de estimulação pelo peptídeo também podem servir como alvos de ataque por CTLs ativados.

[00229] Em algumas modalidades, os CTLs da presente invenção podem reconhecer células que apresentam complexos de um antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 e o peptídeo da presente invenção sobre sua superfície. No contexto de CTLs, a frase "reconhecem uma célula" refere-se à ligação de um complexo de um antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 e o peptídeo da presente invenção sobre a superfície celular via seu TCR e que mostra atividade citotóxica específica contra a célula. Aqui, "atividade citotóxica específica" refere-se a mostrar atividade citotóxica contra a célula que apresenta um complexo de um antígeno HLA-A24 ou HLA-A2 e o peptídeo da presente invenção, mas não outras células. Consequentemente, os CTL que mostram atividade citotóxica específica contra uma célula que apresenta o peptídeo da presente invenção estão incluídos na presente invenção.

[00230] Em modalidades típicas, o CTL da presente invenção é capaz de reconhecer uma célula que apresenta um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 ou 28 (ou um peptídeo modificado do mesmo) via um HLA-A24. Em modalidades preferidas, tais CTLs da presente invenção podem reconhecer uma célula que expressa uma TOPK e HLA-A24 (por exemplo, células cancerosas positivas para HLA-A24).

[00231] Em outras modalidades, o CTL da presente invenção é capaz de reconhecer uma célula que apresenta um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54,

62, 63, 64, 66, 71 , 72 ou 76 (ou um peptídeo modificado do mesmo) via um HLA A2. Em modalidades preferidas, tais CTLs da presente invenção podem reconhecer uma célula que expressa uma TOPK e HLA-A2 (por exemplo, células cancerosas positivas para HLA-A2).

VIII. Receptor de Células T (T Cell Receptor - TCR)

[00232] A presente invenção fornece também uma composição que inclui um ou mais polinucleotídeos que codificam polipeptídeos que são capazes de formação de uma subunidade de um receptor de células T (T Cell Receptor - TCR) e métodos de uso dos mesmos. Tais subunidades de TCR têm a capacidade de formar TCRs que conferem especificidade às células T contra células tumorosas que expressam TOPK. Usando métodos conhecidos na técnica, os polinucleotídeos que codificam cada uma das cadeias alfa e beta, como as subunidades de TCR do CTL induzido com os peptídeos da presente invenção, podem ser identificados (documento WO 2007/032255 e Morgan *et al.*, *J Immunol*, 171, 3288 (2003)). Por exemplo, o método de PCR é preferido para analisar o TCR. Os iniciadores de PCR para a análise podem ser, por exemplo, iniciadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO: 87) como um iniciador do lado 5' e iniciadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 88) específicos para a região C de cadeia alfa de TCR, iniciadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 89) específicos para a região C de cadeia beta de TCR ou iniciadores 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaa-tcctttctctt-3') (SEQ ID NO: 90) específicos para a região C2 de cadeia beta de TCR como um iniciador do lado 3', porém sem limitações aos mesmos. Os TCRs derivados podem se ligar à células alvo que apresentam o peptídeo de TOPK com alta avidéz e, opcionalmente, mediar a morte eficiente de células alvo que apresentam o peptídeo de TOPK da presente invenção *in vivo* e *in vitro*.

[00233] O polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam subunida-

des de TCR (isto é, o polinucleotídeo que codifica ambas as subunidades de TCR ou polinucleotídeos que codificam cada uma das subunidades de TCR) podem ser incorporados em vetores adequados, por exemplo, vetores retrovirais. Estes vetores são bem conhecidos na técnica. Os ácidos nucleicos ou os vetores que os incluem podem, vantajosamente, ser transferidos para uma célula T (por exemplo, célula T CD8 positiva), por exemplo, uma célula T de um paciente. Vantajosamente, a presente invenção fornece uma composição normalmente disponível que permite rápida modificação das células T do próprio paciente (ou aquelas de outro mamífero) para produzir rápida e facilmente células T modificadas que têm excelentes propriedades de morte de células cancerosas.

[00234] TCRs específicos contra os peptídeos da presente invenção deverão ser capazes de reconhecer especificamente um complexo de um peptídeo da presente invenção e um antígeno HLA, conferindo a uma célula T atividade específica contra a célula alvo que apresenta um complexo do peptídeo da presente invenção e um antígeno HLA quando o TCR é expresso sobre a superfície da célula T. A atividade requerida pode ser confirmada por meio de quaisquer métodos conhecidos se CTL preparado por meio de introdução do(s) polipeptídeo(s) que codifica(m) tais subunidades de TCR podem reconhecer especificamente tais células alvo. Exemplos preferidos de tais métodos incluem, por exemplo, análise de tetrâmero usando moléculas de HLA e os peptídeos da presente invenção e ensaio ELISPOT. Através do ensaio ELISPOT, pode-se confirmar que CTLs preparados por meio do método conforme descrito acima podem reconhecer especificamente as células alvo e que os sinais gerados por tal reconhecimento são transmitidos intracelularmente. Além disso, pode ser confirmado, por meio de um método conhecido, que CTLs preparados por meio do método descrito acima têm atividade citotóxica específica contra as célu-

las alvo. Exemplos de tais métodos incluem, por exemplo, o ensaio de liberação de cromo usando células que expressam TOPK e HLA-A24 ou HLA-A2.

[00235] Em um aspecto, a presente invenção fornece CTLs que são preparados por meio de transdução com os polipeptídeo/polipeptídeos que codificam os polipeptídeos de subunidades de TCR (isto é, o polinucleotídeo que codifica ambas as subunidades de TCR ou polinucleotídeos que codificam cada uma das subunidades de TCR), em que o TCR formado por tais subunidades de TCR podem se ligar a um complexo do peptídeo de TOPK tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 e um antígeno HLA-A24 sobre a superfície celular ou podem se ligar a um complexo do peptídeo de TOPK tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42 a 84 e um antígeno HLA-A2 sobre a superfície celular.

[00236] Os CTLs transduzidos são capazes de alojamento em células cancerosas *in vivo* e podem ser expandidos por meio de métodos de cultura *in vitro* bem conhecidos (por exemplo, Kawakami *et al.*, *J Immunol.*, 142, 3452-3461 (1989)). Os CTLs da presente invenção podem ser usados para formar uma composição imunogênica útil em um ou ambos de tratamento e prevenção de câncer em um paciente que precisa de terapia ou proteção (vide documento WO 2006/031221, os conteúdos do qual são incorporados por referência aqui).

IX. Agentes ou Composições Farmacêuticas

[00237] Uma vez que expressão de TOPK é especificamente elevada em cânceres, exemplos dos quais incluem, porém necessariamente sem limitações, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles quando comparado com tecido normal, os peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção podem

ser usados para induzir a uma resposta imune contra câncer e, assim, servem para tratar e/ou prevenir câncer e/ou prevenir uma recorrência metastática ou pós-operatória do mesmo. Assim, a presente invenção fornece agentes ou composições farmacêuticas formuladas para o tratamento e/ou profilaxia de câncer e/ou para a prevenção de uma recorrência pós-operatória do mesmo, tais composições ou agentes incluindo, como ingrediente ativo, um ou mais dos peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção como um ou mais ingredientes ativos. Alternativamente, os peptídeos da presente invenção podem ser expressados sobre a superfície de que qualquer um dos exossomos ou células precedentes, tais como APCs, para o uso como agentes ou composições farmacêuticas. Além disso, os CTLs mencionados antes, os quais objetivam qualquer um dos peptídeos da presente invenção, também podem ser usados como o ingrediente ativo dos presentes agentes ou composições farmacêuticas.

[00238] Consequentemente, a presente invenção proporciona agentes ou composições que incluem pelo menos um ingrediente ativo selecionado dentre:

[00239] um ou mais peptídeos da presente invenção;

[00240] um ou mais polinucleotídeos que codificam tal peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00241] uma ou mais APCs ou um exossomo da presente invenção; e

[00242] um ou mais CTLs da presente invenção.

[00243] Os agentes ou as composições farmacêuticas da presente invenção também encontram uso como uma vacina. No contexto da presente invenção, o termo "vacina" (referida também como uma "composição imunogênica") refere-se a um agente ou composição que tem a função de aprimorar, intensificar e/ou induzir à imunidade anti-tumor quando de inoculação em um animal. Em outras palavras, a presente invenção proporciona os agentes ou composições farmacêu-

ticas para indução de uma resposta imune contra câncer em um indivíduo.

[00244] Os agentes ou as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usadas para tratar e/ou prevenir câncer e/ou prevenir uma recorrência metastática ou pós-operatória do mesmo em indivíduos ou pacientes. Exemplos de tais indivíduos incluem seres humanos, bem como outros mamíferos incluindo, porém sem limitações, camundongos, ratos, porquinhos-da-índia, coelhos, gatos, cães, ovelhas, cabras, porcos, gados, cavalos, macacos, babuínos e chimpanzés, particularmente animais comercialmente importantes ou animais domesticados. Em algumas modalidades, os agentes ou composições farmacêuticas da presente invenção podem ser formulados para a administração a um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A24 ou HLA-A2.

[00245] Em outra modalidade, a presente invenção fornece também o uso de um ingrediente ativo na fabricação de uma composição ou agente farmacêutico para tratamento e/ou prevenção de câncer ou tumor e/ou prevenção de uma recorrência pós-operatória do mesmo, o referido ingrediente ativo selecionado dentre:

[00246] um peptídeo da presente invenção;

[00247] um polinucleotídeo que codifica tal peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00248] uma APC que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície;

[00249] um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície; e

[00250] uma célula T citotóxica da presente invenção.

[00251] Alternativamente, a presente invenção fornece também um ingrediente ativo para uso em qualquer um ou ambos de tratamento e/ou prevenção de cânceres ou tumores e/ou prevenção de uma recor-

rência pós-operatória dos mesmos, o dito ingrediente ativo selecionado dentre:

[00252] um peptídeo da presente invenção;

[00253] um polinucleotídeo que codifica tal peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00254] uma APC que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície;

[00255] um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície; e

[00256] uma célula T citotóxica da presente invenção.

[00257] Alternativamente, a presente invenção fornece também um método ou processo para a fabricação de uma composição ou um agente farmacêutico para tratamento e/ou prevenção de um câncer ou tumor e/ou prevenção de uma recorrência pós-operatória do mesmo, em que o método ou o processo inclui as etapas de formulação de um veículo farmacêutica ou fisiologicamente aceitável com um ingrediente ativo selecionado dentre:

[00258] um peptídeo da presente invenção;

[00259] um polinucleotídeo que codifica tal peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00260] uma APC que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície;

[00261] um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície; e

[00262] uma célula T citotóxica da presente invenção.

[00263] Em outra modalidade, a presente invenção fornece também um método ou um processo para a fabricação de uma composição ou um agente farmacêutico para tratamento e/ou prevenção de um câncer ou tumor e/ou prevenção de uma recorrência pós-operatória do mesmo, em que o método ou o processo inclui as etapas de mistura de um

ingrediente ativo com um veículo farmacêutica ou fisiologicamente aceitável, em que o ingrediente ativo é selecionado dentre:

[00264] um peptídeo da presente invenção;

[00265] um polinucleotídeo que codifica tal peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00266] uma APC que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície;

[00267] um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície; e

[00268] uma célula T citotóxica da presente invenção.

[00269] Em outra modalidade, a presente invenção fornece também um método para um tratamento e/ou prevenção de um câncer ou tumor e/ou prevenção de uma recorrência pós-operatória do mesmo, em que o método compreende a etapa de administração, a um indivíduo, de pelo menos um ingrediente ativo selecionado dentre:

[00270] um peptídeo da presente invenção;

[00271] um polinucleotídeo que codifica tal peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00272] uma APC que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície;

[00273] um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície; e

[00274] uma célula T citotóxica da presente invenção.

[00275] De acordo com a presente invenção, descobriu-se que peptídeos que têm uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 a 40 pode ser peptídeos de epítipo restrito ao HLA-A24. Dentre estes peptídeos, peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28 podem induzir efetivamente a uma resposta imune potente e específica contra um câncer que expressa HLA-A24 e TOPK em um indivíduo. Do mes-

mo modo, os peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42 e 84 podem ser peptídeos de epítipo restrito ao HLA-A2. Dentre estes peptídeos, peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 podem induzir efetivamente a uma resposta imune potente e específica contra um câncer que expressa HLA-A2 e TOPK em um indivíduo. Portanto, as composições ou agentes farmacêuticos os quais incluem qualquer um dos peptídeos com a sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2 to 40 (especialmente SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28) e polipeptídeos modificados dos mesmo são particularmente adequados para administração a indivíduos cujo antígeno HLA é HLA-A24. Similarmente, as composições ou agentes farmacêuticos os quais incluem qualquer um dos peptídeos com a sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42 to 84 (especialmente SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76) e polipeptídeos modificados dos mesmo são particularmente adequados para administração a indivíduos cujo antígeno HLA é HLA-A2. O mesmo se aplica à composições ou agentes farmacêuticos que contêm polinucleotídeos que codificam qualquer um destes peptídeos (isto é, os polinucleotídeos da presente invenção).

[00276] Cânceres a serem tratados pelas composições ou agentes farmacêuticos da presente invenção não são limitados e incluem todos os tipos de cânceres em que TOPK está envolvida incluindo, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[00277] As composições ou os agentes farmacêuticos da presente invenção podem conter, além dos ingredientes ativos antes menciona-

dos, outros peptídeos que têm a capacidade de induzir a CTLs contra células cancerosas, outros polinucleotídeos que codificam os outros peptídeos, outras células que apresentam os outros peptídeos e similares. Exemplos de tais "outros" peptídeos tendo a capacidade de induzir a CTLs contra células cancerosas incluem, porém sem limitações, antígenos específicos para câncer (por exemplo, TAAs identificados).

[00278] Se necessário, as composições ou agentes farmacêuticos da presente invenção podem incluir opcionalmente outras substâncias terapêuticas como um ingrediente ativo, contanto que a substância não iniba o efeito antitumoral do ingrediente ativo, por exemplo, qualquer um dos presentes peptídeos da presente invenção. Por exemplo, formulações podem incluir substâncias anti-inflamatórias, analgésicos, agentes quimioterapêuticos e similares. Além de inclusão de outras substâncias terapêuticas no medicamento em si, os medicamentos da presente invenção podem ser também administrados sequencial ou concomitantemente com uma ou mais de outras composições farmacológicas. As quantidades de medicamento e composição farmacológica dependem, por exemplo, de qual tipo de composição(ões) farmacológica(s) é usado, a doença que está sendo tratada e o esquema e vias de administração.

[00279] Aqueles versados na técnica reconhecerão que, além dos ingredientes particularmente mencionados aqui, as composições ou agentes farmacêuticos da presente invenção podem incluir outras substâncias convencionais na técnica tendo relação com o tipo de formulação em questão (por exemplo, materiais de enchimento, aglutinantes, diluentes, excipientes, etc.).

[00280] Em uma modalidade da presente invenção, as composições ou agentes da presente invenção podem ser incluídos em artigos de manufatura e *kits* que contêm materiais úteis para tratamento das

condições patológicas da doença a ser tratada, por exemplo, câncer. O artigo de manufatura pode incluir um recipiente de qualquer uma das composições ou agentes farmacêuticos com um rótulo. Recipientes adequados incluem garrafas, frascos e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O rótulo sobre o recipiente deverá indicar a composição ou agente usado para tratamento ou prevenção de uma ou mais condições da doença. O rótulo pode indicar também orientações para administração e assim por diante.

[00281] Além do recipiente descrito acima, um *kit* que inclui uma composição ou agente farmacêutico da presente invenção pode incluir ainda opcionalmente um segundo recipiente que aloja um diluente farmaceuticamente aceitável. Ele pode incluir ainda outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções para uso.

[00282] As composições ou agentes farmacêuticos podem, se desejado, ser acondicionados em uma embalagem ou dispositivo distribuidor o qual pode conter uma ou mais formas de dosagem unitária contendo o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, incluir folha de metal ou plástico, tal como uma embalagem de blíster. A embalagem ou dispositivo distribuidor pode ser acompanhado por instruções para administração.

Agentes ou composições farmacêuticas que contêm os peptídeos como o ingrediente ativo

[00283] Os peptídeos da presente invenção podem ser administrados diretamente como uma composição ou agente farmacêutico ou, se necessário, podem ser formulados por meio de métodos convencionais de formulação. No último caso, além dos peptídeos da presente invenção, veículos, excipientes, e similares, que são comumente usa-

dos para fármacos, podem ser incluídos conforme apropriado sem limitações particulares. Exemplos de tais veículos incluem, porém sem limitações, água esterilizada, solução salina fisiológica, tampão de fosfato, fluido de cultura e similares. Além disso, as composições ou agentes farmacêuticos podem conter, conforme necessário, estabilizantes, suspensões, conservantes, tensoativos e similares. As composições ou agentes farmacêuticos da presente invenção podem ser usados para fins anticâncer.

[00284] Os peptídeos da presente invenção podem ser preparados como uma combinação composta de dois ou mais peptídeos da presente invenção, para induzir a CTLs *in vivo*. A combinação peptídica pode tomar a forma de um coquetel ou pode ser conjugada uma à outra usando técnicas padrões. Por exemplo, os peptídeos podem ser quimicamente ligados ou expressos como uma única sequência polipeptídica de fusão. Os peptídeos na combinação podem ser os mesmos ou diferentes. Administrando os peptídeos da presente invenção, os peptídeos são apresentados em uma alta densidade pelos antígenos HLA em APCs, então, CTLs que reagem especificamente com o complexo formado entre o peptídeo apresentado e o antígeno HLA são induzidos. Alternativamente, as APCs (por exemplo, DCs) são removidas dos indivíduos e, em seguida, estimuladas pelos peptídeos da presente invenção para obter APCs que apresentam qualquer um dos peptídeos da presente invenção sobre sua superfície celular. Estas APCs são administradas novamente aos indivíduos para induzir a CTLs nos indivíduos, e como um resultado, a agressividade contra o endotélio associado ao tumor pode ser aumentada.

[00285] As composições ou os agentes farmacêuticos para o tratamento e/ou a prevenção de câncer contendo qualquer peptídeo da presente invenção como o ingrediente ativo podem também incluir um adjuvante conhecido por estabelecer eficazmente imunidade celular.

Alternativamente, as composições ou agentes farmacêuticos podem ser administrados com outros ingredientes ativos ou administrados por formulação em grânulos. O termo "adjuvante" refere-se a um composto que intensifica a resposta imune contra a proteína quando administrado junto (ou sucessivamente) com a proteína que tem atividade imunológica. Exemplos de adjuvantes adequados considerados aqui incluem aqueles descritos na literatura (*Clin Microbiol Rev* 1994, 7: 277-89). Exemplos de adjuvantes adequados incluem, porém sem limitações, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, alume, toxina do cólera, toxina de salmonela, Adjuvante Incompleto de Freund (Incomplete Freund's adjuvant - IFA), Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant - CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsão O/W e similares.

[00286] Além disso, formulações de lipossomas, formulações granulares nas quais o peptídeo é ligado a glóbulos com diâmetro de poucos micrômetros e formulações nas quais um lipídio é ligado ao peptídeo podem ser convenientemente usadas.

[00287] Em outra modalidade da presente invenção, os peptídeos da presente invenção podem ser administrados também na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Exemplos de sais preferidos incluem sais com um metal alcalino, sais com um metal, sais com uma base orgânica, sais com um ácido orgânico (por exemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzóico, ácido metanossulfônico e assim por diante) e sais com um ácido inorgânico (por exemplo, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico e assim por diante). Conforme usado aqui, a frase "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se àqueles sais que retêm a eficácia biológica e as propriedades do composto e os quais são obtidos mediante reação com ácidos ou bases inorgânicas,

tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido salicílico e similares.

[00288] Em algumas modalidades, as composições ou agentes farmacêuticos da presente invenção podem ainda incluir um componente que efetua o *priming* de CTLs. Lipídios foram identificados como substâncias capazes de *priming* CTLs *in vivo* contra antígenos virais. Por exemplo, resíduos de ácido palmítico podem ser presos aos grupos épsilon- e alfa-amino de um resíduo de lisina e, em seguida, ligados a um peptídeo da presente invenção. O peptídeo lipidado pode, então, ser administrado diretamente em uma micela ou partícula, incorporado em um lipossoma ou emulsificado em um adjuvante. Como outro exemplo de *priming* por lipídio de respostas de CTL, lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS), podem ser usados para efetuar o *priming* de CTLs quando presas de forma covalente a um peptídeo apropriado (vide, por exemplo, Deres *et al.*, *Nature* 1989, 342: 561-4).

[00289] Exemplos de métodos de administração adequados incluem, porém necessariamente sem limitações, administração oral, injeção intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraóssea, peritoneal e intravenosa ou similares e administração sistêmica ou administração local até a proximidade dos locais objetivados (isto é, injeção direta). A administração pode ser realizada por meio de uma única administração ou reforçada por múltiplas administrações. A dose dos peptídeos da presente invenção pode ser ajustada adequadamente de acordo com a doença a ser tratada, a idade do paciente, peso, método de administração e similares e é, comumente, 0,001 mg a 1000 mg, por exemplo, 0,01 mg a 100 mg, por exemplo, 0,1 mg a 10 mg, por exemplo, 0,5 mg a 5 mg, e pode ser administrada uma vez em uns poucos dias a poucos meses. Aqueles versados na técnica podem determinar

prontamente dosagens ideais adequadas.

(2) Agentes ou composições farmacêuticas que contêm polinucleotídeos como ingrediente ativo

[00290] As composições ou os agentes farmacêuticos da presente invenção podem conter também ácidos nucleicos que codificam os peptídeos da presente invenção em uma forma passível de expressão. Aqui, a frase "em uma forma passível de expressão" significa que o polinucleotídeo, quando introduzido em uma célula, será expresso *in vivo* como um polipeptídeo que induz à imunidade antitumor. Em uma modalidade ilustrativa, a sequência de ácidos nucleicos do polinucleotídeo de interesse inclui elementos reguladores necessários para expressão do polinucleotídeo. O(s) polinucleotídeo(s) pode(m) ser equipado(s) de modo a obter inserção estável no genoma da célula alvo (vide, por exemplo, Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 para uma descrição de vetores de cassete de recombinação homóloga). Vide, por exemplo, Wolff *et al.*, *Science* 1990, 247: 1465-8; Patentes US Nos. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; e documento WO 98/04720). Exemplos de tecnologias de distribuição com base em DNA incluem "DNA nu", distribuição facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por peptídeo), complexos lipídicos catiônicos e distribuição mediada por partículas ("pistola de gene") ou distribuição mediada por pressão (vide, por exemplo, Patente US No. 5.922.687).

[00291] Os peptídeos da presente invenção podem ser expressos também por vetores virais ou bacterianos. Exemplos de vetores de expressão incluem hospedeiros virais atenuados, tais como vacínia ou boubá aviária. Esta abordagem envolve o uso de vírus da vacínia, por exemplo, como um vetor, para expressar sequências de nucleotídeos que codificam o peptídeo. Quando de introdução em um hospedeiro, o vírus da vacínia recombinante expressa o peptídeo imunogênico e,

deste modo, estimula uma resposta imune. Vetores de vacínia e métodos úteis em protocolos de imunização são descritos, por exemplo, na Patente US No. 4.722.848. Outro vetor é BCG (Bacille Calmette Guérin - bacilo de Calmette-Guérin). Vetores de BCG são descritos em Stover *et al.*, *Nature* 1991, 351: 456-60. Uma ampla variedade de outros vetores úteis para administração terapêutica ou imunização, por exemplo, vetores de adenovírus e associados a adenovírus, vetores retrovirais, vetores de *Salmonella typhi*, vetores da toxina antraz desintoxicados e similares, serão evidentes. Vide, por exemplo, Shata *et al.*, *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock *et al.*, *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp *et al.*, *In Vivo* 2000, 14: 571-85.

[00292] A distribuição de um polinucleotídeo para um paciente pode ser direta, caso no qual o paciente é exposto diretamente a um vetor que traz polinucleotídeo, ou indireta, caso no qual células são primeiramente transformadas com o polinucleotídeo de interesse *in vitro*, em seguida, as células são transplantadas no paciente. Estas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapias gênicas *in vivo* e *ex vivo*.

[00293] Para revisões gerais dos métodos de terapia gênica vide Goldspiel *et al.*, *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu e Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215). Métodos comumente conhecidos na técnica de tecnologia de DNA recombinante que são aplicáveis à presente invenção são descritos por Ausubel *et al.* em "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY, 1993; e por Krieger em "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual", (Stockton Press, NY, 1990).

[00294] Assim como a administração de peptídeos, a administração de polinucleotídeos pode ser realizada através de administração oral,

injeção intradérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraóssea e/ou peritoneal ou similar e administração via sistêmica ou administração local até a proximidade dos locais objetivados. A administração pode ser realizada por meio de uma única administração ou reforçada por múltiplas administrações. A dose dos peptídeos da presente invenção pode ser ajustada adequadamente de acordo com a doença a ser tratada, a idade do paciente, peso, método de administração e similares e é, comumente, 0,001 mg a 1000 mg, por exemplo, 0,01 mg a 100 mg, por exemplo, 0,1 mg a 10 mg, por exemplo, 0,5 a 5 mg, e pode ser administrada uma vez em uns poucos dias a poucos meses. Aqueles versados na técnica podem determinar prontamente dosagens ideais adequadas.

X. Métodos de Uso dos Peptídeos, Polinucleotídeos, Exossomos, APCs e CTLs

[00295] Os peptídeos e polinucleotídeos da presente invenção podem ser usados para o preparo ou indução de APCs e CTLs. Os exossomos e APCs da presente invenção também podem ser usados para preparo ou indução de CTLs. Os peptídeos, polinucleotídeos, exossomos e APCs podem ser usados em combinação com outros compostos, contanto que os compostos adicionais não inibam a capacidade de indução de CTLs. Assim, qualquer uma das composições ou agentes farmacêuticos mencionados antes da presente invenção pode ser usado para preparo ou indução de CTLs. Além disso, aqueles que incluem os peptídeos ou polinucleotídeos podem ser usados também para preparo ou indução de APCs, conforme discutido abaixo.

Método de indução de células que apresentam antígenos (Antigen-Presenting Cells - APCs)

[00296] A presente invenção fornece métodos de indução de APCs com alta capacidade de indução de CTLs usando os peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção. Os métodos da presente inven-

ção incluem a etapa de contato de APCs com os peptídeos da presente invenção *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Por exemplo, o método de indução de APCs com os peptídeos *ex vivo* podem incluir as etapas de:

[00297] a: coleta de APCs de um indivíduo; e

[00298] b: contato das APCs da etapa "a" com o peptídeo da presente invenção.

[00299] As APCs não estão limitadas a um tipo específico de células. Exemplos de APCs incluem, porém sem limitações, DCs, células de Langerhans, macrófagos, células B e células T ativadas, as quais são conhecidas por apresentar antígenos proteínáceos sobre sua superfície celular, de modo a serem reconhecidas por linfócitos. De preferência, DCs podem ser usadas, uma vez que elas têm a capacidade de indução de CTL mais forte dentre as APCs. Qualquer um dos peptídeos da presente invenção pode ser usado em si ou em combinação com outros peptídeos da presente invenção ou peptídeos passíveis de indução por CTL derivados de outros TAAs que não TOPK.

[00300] Por outro lado, quando os peptídeos da presente invenção são administrados a um indivíduo, as APCs são contatadas com os peptídeos *in vivo* e, conseqüentemente, as APCs com alta capacidade de indução de CTLs são induzidas no corpo do indivíduo. Assim, o método da presente invenção pode incluir a etapa de administração de um peptídeo da presente invenção a um indivíduo para induzir a uma APC com capacidade de indução de CTL no corpo do indivíduo. Similarmemente, quando os polinucleotídeos da presente invenção são administrados a um indivíduo em uma forma passível de expressão, os peptídeos da presente invenção são expressos e contatados com APCs *in vivo* e, conseqüentemente, as APCs com capacidade de indução de CTLs são induzidas no corpo do indivíduo. Assim, os métodos da presente invenção podem incluir a etapa de administração de um polinucleotídeo da presente invenção a um indivíduo para induzir a

uma APC com capacidade de indução de CTL no corpo do indivíduo. A frase "forma passível de expressão" foi descrita acima na seção "IX. Agentes ou Composições farmacêuticas" e "(2) Agentes e composições farmacêuticas que contêm os polinucleotídeos como o ingrediente ativo".

[00301] Alternativamente, os métodos da presente invenção podem incluir a etapa de introdução de um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção em uma APC para induzir a uma APC com capacidade de indução de CTL. Por exemplo, o método pode incluir as etapas de:

[00302] a: coleta de APCs de um indivíduo; e

[00303] b: introdução de um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção na APC da etapa a.

[00304] A etapa "b" pode ser realizada conforme descrito acima na seção "VI. Células que apresentam antígeno".

[00305] Alternativamente, os métodos da presente invenção podem incluir a etapa de preparo de uma célula que apresenta antígeno (Antigen-Presenting Cell - APC) que pode induzir especificamente à atividade de CTL contra TOPK, via uma ou mais das seguintes etapas:

[00306] contato de uma APC com um peptídeo da presente invenção *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*; e

[00307] introdução de um polinucleotídeo que codifica um peptídeo da presente invenção em uma APC.

[00308] Alternativamente, os métodos da presente invenção podem servir para induzir a uma APC tendo capacidade de indução de CTL, tais métodos incluindo uma etapa selecionada dentre:

[00309] contato de uma APC com o peptídeo da presente invenção; e

[00310] introdução do polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção em uma APC.

[00311] Em uma modalidade preferida, a presente invenção propor-

ciona o método de indução ou preparo de uma APC tendo capacidade de indução de CTL, tal método incluindo uma das seguintes etapas:

[00312] contato de uma APC que expressa HLA-A24 com um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 2 a 40 (especialmente SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 27 e 28) ou um peptídeo modificado do mesmo *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*; e

[00313] introdução de um polinucleotídeo que codifica um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 2 a 40 (especialmente SEQ ID NOS: 2, 3, 6, 27 e 28) ou um peptídeo modificado do mesmo em uma APC expressando HLA-A2.

[00314] APCs induzidas por meio do método acima apresentam tais peptídeos via HLA-A24 sobre sua superfície e podem induzir a CTLs tendo atividade citotóxica específica contra células que expressam HLA-A24 e TOPK.

[00315] Em outra modalidade, a presente invenção proporciona o método de indução ou preparo de uma APC tendo capacidade de indução de CTL, tal método incluindo uma das seguintes etapas:

[00316] contato de uma APC que expressa HLA-A2 com um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NOS: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76) ou um peptídeo modificado do mesmo *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*; e

[00317] introdução de um polinucleotídeo que codifica um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOS: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NOS: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76) ou um peptídeo modificado do mesmo em uma APC expressando HLA-A2.

[00318] APCs induzidas por meio do método acima apresentam tais peptídeos via HLA-A2 sobre sua superfície e podem induzir a CTLs tendo atividade citotóxica específica contra células que expressam

HLA-A2 e TOPK

[00319] Os métodos da presente invenção podem ser realizados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. De preferência, os métodos da presente invenção podem ser realizados *in vitro* ou *ex vivo*. APCs usadas para indução de APCs tendo capacidade de indução de CTL podem, de preferência, ser APCs que expressam o antígeno HLA-A24 ou HLA-A2. APCs podem ser preparadas por meio de métodos bem conhecidos na técnica a partir de células mononucleares de sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC) obtidas de um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A24 ou HLA-A2. As APCs induzidas por meio do método da presente invenção podem ser APCs que apresentem um complexo do peptídeo da presente invenção e antígeno HLA (antígeno HLA A24 ou HLA-A2) sobre sua superfície. Quando APCs induzidas por meio do método da presente invenção são administradas a um indivíduo de forma a induzir às respostas imunes contra câncer no indivíduo, o indivíduo é, de preferência, o mesmo do qual as APCs são derivadas. No entanto, o indivíduo pode ser um diferente do doador de APC, contanto que o indivíduo tenha o mesmo tipo de HLA que o doador de APC.

[00320] Em outra modalidade, a presente invenção proporciona agentes ou composições para uso em indução de uma APC que tendo capacidade de indução de CTL e tais agentes ou composições incluem um ou mais peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção.

[00321] Em outra modalidade, a presente invenção proporciona o uso do peptídeo da presente invenção ou do polinucleotídeo que codifica o peptídeo na fabricação de um agente ou composição formulada para indução de APCs.

[00322] Alternativamente, a presente invenção proporciona ainda o peptídeo da presente invenção ou o polipeptídeo que codifica o peptídeo para uso na indução de uma APC que tem capacidade de indução

de CTL.

(2) Método de indução de CTLs

[00323] A presente invenção fornece também métodos para indução de CTLs usando os peptídeos, polinucleotídeos, exossomos ou APCs da presente invenção.

[00324] A presente invenção fornece também métodos para indução de CTLs usando um polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam polipeptídeos (isto é, subunidades de TCR) que são capazes de formação de uma subunidade de receptor de células T (T Cell Receptor - TCR) que é capaz de reconhecer um complexo do peptídeo da presente invenção e um antígeno HLA. De preferência, os métodos para indução de CTLs incluem pelo menos uma etapa selecionada dentre:

[00325] a: contato de uma célula T CD8 positiva em contato com uma célula que apresenta antígeno e/que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção;

[00326] b. contato de uma célula T CD8 positiva com um exossomo que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção; e

[00327] c: introdução de um polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam polipeptídeos que são capazes de formação de um TCR que é capaz de reconhecer um complexo de um peptídeo da presente invenção e um antígeno HLA em uma célula T CD8 positiva.

[00328] Quando os peptídeos, polinucleotídeos, APCs ou exossomos da presente invenção são administrados a um indivíduo, CTLs são induzidos no corpo do indivíduo e a potência da resposta imune que objetiva as células cancerosas expressando TOPK é intensificada. Assim, em vez da etapa mencionada acima, os métodos da presente invenção podem incluir a etapa de administração dos peptídeos, poli-

nucleotídeos, APCs ou exossomos da presente invenção a um indivíduo.

[00329] Alternativamente, CTLs podem ser induzidos também usando o mesmo *ex vivo* e, após indução de CTLs, os CTLs ativados são retornados para o indivíduo. Por exemplo, o método pode incluir as etapas de:

[00330] a: coleta de APCs de um indivíduo,

[00331] b: contato das APCs da etapa "a" com o peptídeo da presente invenção, e

[00332] c: cocultura das APCs da etapa "b" com células T CD8 positivas.

[00333] As APCs a serem cocultivadas com as células T CD8 positivas na etapa "c" acima podem ser preparadas também por meio de transferência de um gene que inclui um polinucleotídeo da presente invenção para APCs, conforme descrito acima na seção "VI. Células que apresentam antígeno", embora a presente invenção não esteja limitada ao mesmo e, assim, abrange quaisquer APCs que apresentem eficazmente, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção.

[00334] Pode-se utilizar, opcionalmente, um exossomo que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção em vez das APCs mencionadas antes. Isto é, a presente invenção inclui a etapa de cocultura de exossomos que apresentam, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção. Tais exossomos podem ser preparados por meio dos métodos descritos acima na seção "V. Exossomos". APCs e exossomos adequados para o método da presente invenção apresentam um complexo do peptídeo da presente invenção e HLA-A24 ou HLA-A2 sobre sua superfície. Por exemplo, uma APC ou exossomo que apresenta um complexo de HLA-A24 e um peptídeo

tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 2, 3, 6, 27 e 28 (ou um peptídeo modificado do mesmo) sobre sua superfície pode, de preferência, ser utilizado para indução de um CTL tendo atividade citotóxica específica contra uma célula que expressa HLA-A24 e TOPK. Da mesma forma, uma APC ou exossomo que apresenta um complexo de HLA-A2 e um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 e 76 (ou um peptídeo modificado do mesmo) sobre sua superfície pode, de preferência, ser utilizado para indução de um CTL tendo atividade citotóxica específica contra uma célula que expressa HLA-A2 e TOPK.

[00335] Além disso, o CTL da presente invenção pode ser induzido por meio de introdução em uma célula T CD8 positiva de um polinucleotídeo/polinucleotídeos que codificam subunidades de TCR, em que o TCR formado por tais subunidades de TCR é capaz de ligação a um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção sobre uma superfície celular. Tal transdução pode ser realizada conforme descrito acima na seção "VIII. Receptor de células T (TCR)".

[00336] Os métodos da presente invenção podem ser realizados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. De preferência, os métodos da presente invenção podem ser realizados *in vitro* ou *ex vivo*. APCs usadas para indução de CTLs tendo capacidade de indução de CTL podem, de preferência, ser APCs que expressam o antígeno HLA-A24 ou HLA-A2. APCs podem ser preparadas por meio de métodos bem conhecidos na técnica a partir de células mononucleares de sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC) obtidas de um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A24 ou HLA-A2. As APCs induzidas por meio do método da presente invenção podem ser APCs que apresentam um complexo do peptídeo da presente invenção e antígeno HLA (antígeno HLA A24 ou HLA-A2) sobre sua superfície. Tais CTLs po-

dem mostrar atividade citotóxica específica sobre as células que apresentem o peptídeo da presente invenção sobre sua superfície e, portanto, podem mostrar atividade citotóxica específica contra células que expressam TOPK (por exemplo, células cancerosas). Quando APCs induzidas por meio do método da presente invenção são administradas a um indivíduo de forma a induzir à respostas imunes contra câncer no indivíduo, o indivíduo é, de preferência, o mesmo do qual as APCs são derivadas. No entanto, o indivíduo pode ser um diferente do doador de APC, contanto que o indivíduo tenha o mesmo tipo de HLA que o doador de APC.

[00337] Além disso, a presente invenção fornece um método ou processo para fabricação de uma composição ou agente farmacêutico que induz a CTLs, em que o método inclui a etapa de mistura ou formulação do peptídeo da presente invenção com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00338] Em outra modalidade, a presente invenção proporciona um agente ou composição para indução de um CTL, em que o agente ou composição compreende um ou mais peptídeos, um ou mais polinucleotídeos ou uma ou mais APCs ou exossomos da presente invenção.

[00339] Em outra modalidade, a presente invenção proporciona o uso do peptídeo, do polinucleotídeo ou APC ou exossomo da presente invenção na fabricação de um agente ou composição formulada para indução de um CTL. Alternativamente, a presente invenção proporciona ainda o peptídeo, o polinucleotídeo ou APC ou exossomo da presente invenção ou para uso em indução de um CTL.

(3) Métodos de indução de resposta imune

[00340] Além disso, a presente invenção fornece métodos para indução de resposta imune contra doenças relacionadas à TOPK. Doenças consideradas incluem câncer, exemplos os quais incluem, porém

sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[00341] Os métodos da presente invenção podem incluir a etapa de administração de um ou mais agentes ou composições que contêm qualquer um dos peptídeos da presente invenção ou polinucleotídeos que os codificam. Alternativamente, o método da presente invenção também inclui a etapa de administração de exossomos ou APCs que apresentam qualquer um dos peptídeos da presente invenção. Para detalhes, vide o item "IX. Agentes ou Composições Farmacêuticas", particularmente a parte que descreve o uso das composições farmacêuticas da presente invenção como vacinas. Além disso, os exossomos e APCs que podem ser empregados para os presentes métodos para indução de resposta imune são descritos em detalhes nos itens "V. Exossomos", "VI. Células que apresentam antígeno (APCs)" e (1) e (2) de "X. Métodos de uso dos peptídeos, exossomos, APCs e CTLs", acima.

[00342] A presente invenção fornece também um método ou processo para fabricação de um agente ou composição farmacêutica que induz a uma resposta imune contra câncer, em que o método pode incluir a etapa de mistura ou formulação de um peptídeo ou polinucleotídeo da presente invenção com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00343] Alternativamente, o método da presente invenção pode incluir a etapa de administração de uma vacina ou um agente ou composição ou substância farmacêutica da presente invenção que contém:

[00344] (a) um peptídeo da presente invenção;

[00345] (b) um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção em uma forma passível de expressão;

[00346] (c) uma APC que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície;

[00347] (d) um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção sobre sua superfície; ou

[00348] (e) uma célula T citotóxica da presente invenção.

[00349] No contexto da presente invenção, um câncer que superexpressa TOPK pode ser tratado com estes ingredientes ativos. Exemplos de tal câncer incluem, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles. Consequentemente, antes da administração das vacinas ou agentes ou composições ou substâncias farmacêuticas que incluem os ingredientes ativos antes mencionados, é preferível confirmar se o nível e expressão de TOPK no indivíduo a ser tratado é intensificado. Assim, em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para tratamento de câncer que (super)expressa TOPK em um paciente que precisa do mesmo, tal método incluindo as etapas de:

[00350] (i) determinação do nível de expressão de TOPK em (uma) amostra(s) biológica(s) obtida(s) de um indivíduo com o câncer a ser tratado;

[00351] (ii) comparação do nível de expressão de TOPK com um controle normal; e

[00352] (iii) administração de pelo menos um componente selecionado dentre (a) a (e) descritos acima a um indivíduo com câncer que superexpressa TOPK quando comparado com o controle normal.

[00353] Alternativamente, a presente invenção fornece uma vacina ou composição farmacêutica incluindo pelo menos um componente selecionado dentre (a) a (e) descritos acima, a ser administrada a um indivíduo que tem câncer que superexpressa TOPK. Em outras pala-

vras, a presente invenção fornece ainda um método para identificação de um indivíduo a ser tratado com o polipeptídeo de TOPK da presente invenção, tal método incluindo a etapa de determinação de um nível de expressão de TOPK em (uma) amostra(s) biológica(s) derivada(s) do indivíduo, em que um aumento do nível, comparado com um nível do controle normal do gene, indica que o indivíduo pode ter câncer o qual pode ser tratado com o polipeptídeo de TOPK da presente invenção. Os métodos para tratamento de câncer da presente invenção serão descritos em maiores detalhes abaixo.

[00354] Qualquer célula ou tecido derivado de um indivíduo pode ser usado para a determinação de expressão de TOPK, contanto que ele inclua o produto de transcrição ou tradução alvo de TOPK. Exemplos de amostras adequadas incluem, porém sem limitações, tecidos e fluidos corporais, tais como sangue, escarro e urina. De preferência, a amostra de célula ou tecido derivada do indivíduo contém uma população de células incluindo uma célula epitelial, mais preferivelmente uma célula epitelial cancerosa ou uma célula epitelial derivada de um tecido que se suspeita ser canceroso. Além disso, se necessário, a célula pode ser purificada a partir dos tecidos e fluidos corporais obtidos e, em seguida, usada como a amostra derivada do indivíduo. Um indivíduo a ser tratado pelo presente método é, de preferência, um mamífero. Mamíferos ilustrativos incluem, porém sem limitações, por exemplo, um ser humano, primata não humano, camundongo, rato, cão, gato, cavalo e vaca.

[00355] De acordo com a presente invenção, o nível de expressão de TOPK em uma amostra biológica obtida de um indivíduo pode ser determinado. O nível de expressão pode ser determinado no nível de produto de transcrição (ácido nucleico) usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o mRNA de TOPK pode ser quantificado usando sondas por meio de métodos de hibridização (por exemplo,

hibridização *Northern*). A detecção pode ser conduzida sobre um *chip* ou um arranjo. O uso de um arranjo é preferível para detecção do nível de expressão de TOPK. Aqueles versados na técnica podem preparar tais sondas utilizando a informação de sequência de TOPK. Por exemplo, o cDNA de TOPK pode ser usado como as sondas. Se necessário, as sondas podem ser marcadas com um marcador adequado, tais como corantes, substâncias fluorescentes e isótopos, e o nível de expressão do gene pode ser detectado como a intensidade dos marcadores hibridizados.

[00356] Além disso, o produto da transcrição de TOPK pode ser quantificado usando iniciadores por meio de métodos de detecção com base em amplificação (por exemplo, RT-PCR). Tais iniciadores podem ser preparados com base na informação de sequência do gene disponível.

[00357] Especificamente, uma sonda ou iniciador usado para o presente método se hibridiza, sob condições estridentes, moderadamente estridentes ou pouco estridentes, ao mRNA de TOPK. Conforme usado aqui, o termo "condições (de hibridização) estridentes", refere-se à condições sob as quais um sonda ou iniciador hibridizará a sua sequência alvo, mas não à outras sequências. Condições estridentes são dependentes da sequência e serão diferentes sob circunstâncias diferentes. Hibridização específica de sequências mais longas é observada em temperaturas mais altas do que sequências mais curtas. Em geral, a temperatura de uma condição estridente é selecionada para ser cerca de 5 graus Centígrados mais baixa do que o ponto de fusão térmica (T_m) para uma sequência específica em uma intensidade iônica e pH definidos. A T_m é a temperatura (sob uma intensidade iônica, pH e concentração de ácido nucleico definidos) na qual 50% das sondas complementares à sua sequência alvo hibridizam à sequência alvo em equilíbrio. Uma vez que as sequências alvo estão, em geral,

presentes em excesso, na T_m , 50% das sondas estão ocupados em equilíbrio. Tipicamente, condições estridentes serão aquelas nas quais a concentração de sal é [íons de sódio a menos de cerca de 1,0 M, tipicamente íons de sódio (ou outros sais) a menos de cerca de 0,01 a 1,0 M em um pH de 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30 °C para sondas ou iniciadores curtos (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60 °C para sondas ou iniciadores mais longos. Condições estridentes podem ser obtidas também com a adição de substâncias de desestabilização, tal como formamida.

[00358] Uma sonda ou um iniciador da presente invenção é, tipicamente, um oligonucleotídeo substancialmente purificado. O oligonucleotídeo inclui, tipicamente, uma região de sequência de nucleotídeo que hibridiza, sob condições estridentes, a pelo menos cerca de 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 ou 25 nucleotídeos de uma sequência de nucleotídeos fita senso de uma sequência de ácido nucleico incluindo uma sequência de TOPK ou uma sequência de nucleotídeos fita anti-senso de um ácido nucleico incluindo uma sequência de TOPK ou de um mutante que ocorre naturalmente destas sequências. Em particular, por exemplo, em uma modalidade preferida, um oligonucleotídeo que tem 5-50 nucleotídeos de comprimento pode ser usado como um iniciador para amplificar os genes a serem detectados. Mais preferivelmente, o mRNA ou cDNA de um gene de TOPK pode ser detectado com uma sonda ou iniciador de oligonucleotídeo com um tamanho específico, em geral 15-30 b de comprimento. O tamanho pode variar de pelo menos 10 nucleotídeos, pelo menos 12 nucleotídeos, pelo menos 15 nucleotídeos pelo menos 20 nucleotídeos, pelo menos 25 nucleotídeos, pelo menos 30 nucleotídeos e as sondas e iniciadores podem variar, quanto ao tamanho, de 5-10 nucleotídeos, 10-15 nucleotídeos, 15-20 nucleotídeos, 20-25 nucleotídeos e 25-30 nucleotídeos. Em modalidades preferidas, o comprimento da

sonda ou iniciador de oligonucleotídeo pode ser selecionado de 15-25. Procedimentos de ensaio, dispositivos ou reagentes para a detecção do gene usando tal sonda ou iniciador de oligonucleotídeo são bem conhecidos (por exemplo, microarranjo de oligonucleotídeo ou PCR). Nestes ensaios, as sondas ou iniciadores podem incluir também sequências de marcadores ou ligantes. Além disso, as sondas ou iniciadores podem ser modificados com marcador detectável ou ligante de afinidade a ser capturado. Alternativamente, em procedimentos de detecção com base em hibridização, um polinucleotídeo que tem algumas centenas (por exemplo, cerca de 100-200) bases a poucas quilobases (por exemplo, cerca de 1000-2000) de comprimento também pode ser usado para uma sonda (por exemplo, ensaio *Northern blotting* ou análise de microarranjo de cDNA).

[00359] Alternativamente, o produto da tradução pode ser detectado para o diagnóstico da presente invenção. Por exemplo, a quantidade de proteína TOPK (SEQ ID NO: 86) ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma, pode ser determinada. Métodos para determinação da quantidade da proteína como o produto da tradução incluem métodos de imunoensaio que usam um anticorpo que reconhece especificamente a proteína. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal. Além disso, qualquer fragmento ou modificação (por exemplo, anticorpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) do anticorpo pode ser usado para a detecção, contanto que o fragmento ou anticorpo modificado retenha a capacidade de ligação à proteína TOPK. Tais anticorpos contra os peptídeos da presente invenção e os fragmentos dos mesmos também são fornecidos pela presente invenção. Métodos para preparar estes tipos de anticorpos para a detecção de proteínas são bem conhecidos na técnica e qualquer método pode ser empregado na presente invenção para preparar tais anticorpos e equivalentes dos mesmos.

[00360] Como outro método para detectar o nível de expressão do gene de TOPK com base em seu produto de tradução, a intensidade de coloração pode ser medida via análise imuno-histoquímica usando um anticorpo contra a proteína TOPK. Isto é, nesta medição, coloração intensa indica maior presença/nível da proteína e, ao mesmo tempo, alto nível de expressão do gene de TOPK.

[00361] O nível de expressão de um gene alvo, por exemplo, o gene de TOPK, em células cancerosas pode ser determinado como estando aumentado se o nível aumenta a partir do nível de controle (por exemplo, o nível em células normais) do gene alvo, por exemplo, em 10%, 25% ou 50%; ou aumenta para mais de 1,1 vez, mais de 1,5 vez, mais de 2,0 vezes, mais de 5,0 vezes, mais de 10,0 vezes ou mais.

[00362] O nível de controle pode ser determinado ao mesmo tempo que as células cancerosas usando (uma) amostra(s) previamente coletada(s) e armazenada(s) de um indivíduo/indivíduos cujo(s) estado(s) doentio(s) (canceroso ou não canceroso) é/são conhecidos. Além disso, células normais obtidas de regiões não cancerosas de um órgão que tem o câncer a ser tratado podem ser usadas como controle normal. Alternativamente, o nível de controle pode ser determinado por meio de um método estatístico com base nos resultados obtidos analisando (o) nível(eis) de expressão previamente determinado(s) do gene de TOPK em amostras de indivíduos cujos estados doentios são conhecidos. Além disso, o nível de controle pode ser derivado de um banco de dados de padrões de expressão de células previamente testadas. Além disso, de acordo com um aspecto da presente invenção, o nível de expressão do gene de TOPK em uma amostra biológica pode ser comparado com múltiplos níveis de controle, os quais são determinados a partir de múltiplas amostras de referência. É preferido usar um nível de controle determinado a partir de uma amostra de referência derivada de um tipo de tecido similar àquele da amostra biológica deri-

vada do indivíduo. Além disso, é preferido usar o valor padrão dos níveis de expressão do gene de TOPK em uma população com um estado doentio conhecido. O valor padrão pode ser obtido por meio de qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, uma faixa de média ± 2 S.D. ou média ± 3 S.D. pode ser usada como valor padrão.

[00363] No contexto da presente invenção, um nível de controle determinado a partir de uma amostra biológica que é conhecida por não ser cancerosa é referido como um "nível de controle normal". Por outro lado, se o nível de controle é determinado a partir de uma amostra biológica cancerosa, ele é referido como "nível de controle canceroso". A diferença entre um nível de expressão em uma amostra e um nível de controle pode ser normalizada para o nível de expressão de ácidos nucleicos de controle, por exemplo, genes constitutivos (*housekeeping*), cujos níveis de expressão são conhecidos por não diferir, dependendo do estado canceroso ou não canceroso da célula. Genes de controle exemplificativos incluem, porém sem limitações, beta-actina, desidrogenase de gliceraldeído 3 fosfato e proteína ribossômica P1.

[00364] Quando o nível de expressão do gene de TOPK está aumentado quando comparado com o nível de controle normal ou é similar/equivalente ao nível de controle canceroso, o indivíduo pode ser diagnosticado com câncer a ser tratado.

[00365] A presente invenção fornece também um método para (i) diagnosticar se um indivíduo suspeito tem câncer a ser tratado e/ou (ii) seleção de um indivíduo para tratamento de câncer, tal método incluindo as etapas de:

[00366] determinação do nível de expressão de TOPK em (uma) amostra(s) biológica(s) obtida(s) de um indivíduo que se suspeita ter o câncer a ser tratado;

[00367] comparação do nível de expressão de TOPK com um nível

de controle normal;

[00368] diagnóstico do indivíduo como tendo o câncer a ser tratado se o nível de expressão de TOPK está aumentado quando comparado com o nível de controle normal; e

[00369] seleção do indivíduo para tratamento de câncer se o indivíduo é diagnosticado como tendo o câncer a ser tratado na etapa c).

[00370] Alternativamente, tal método pode incluir as etapas de:

[00371] determinação do nível de expressão de TOPK em (uma) amostra(s) biológica(s) obtida(s) de um indivíduo que se suspeita ter o câncer a ser tratado;

[00372] comparação do nível de expressão de TOPK com um nível de controle canceroso;

[00373] diagnóstico do indivíduo como tendo o câncer a ser tratado se o nível de expressão de TOPK é similar ou equivalente ao nível de controle canceroso; e

[00374] seleção do indivíduo para tratamento de câncer se o indivíduo é diagnosticado como tendo o câncer a ser tratado na etapa c).

[00375] A presente invenção fornece também um *kit* diagnóstico para diagnóstico ou determinação de um indivíduo que sofre ou se suspeita sofrer de ou estar em risco de desenvolver um câncer que pode ser tratado com o polipeptídeo de TOPK da presente invenção, o qual pode também ser útil em qualquer um ou ambos de avaliação e monitoramento da eficácia ou aplicabilidade de uma imunoterapia de câncer. De preferência, o câncer inclui, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles. Mais particularmente, o *kit*, de preferência, inclui pelo menos um reagente para detecção da expressão do gene de TOPK em uma célula derivada do indivíduo, reagente o qual que pode ser

selecionado do grupo de:

[00376] um reagente para detecção de um mRNA do gene de TOPK;

[00377] um reagente para detecção da proteína TOPK ou um fragmento imunologicamente ativo da mesma; e

[00378] um reagente para detecção da atividade biológica da proteína TOPK.

[00379] Exemplos de reagentes adequados para detecção de um mRNA do gene de TOPK incluem ácidos nucleicos que se ligam especificamente ou identificam o mRNA de TOPK, tais como oligonucleotídeos que têm uma sequência complementar a uma parte do mRNA de TOPK. Estes tipos de oligonucleotídeos são exemplificados por iniciadores e sondas que são específicos para o mRNA de TOPK. Estes tipos de oligonucleotídeos podem ser preparados com base em métodos bem conhecidos na técnica. Se necessário, o reagente para detecção do mRNA de TOPK pode ser imobilizado sobre uma matriz sólida. Além disso, mais de um reagente para detecção do mRNA de TOPK pode ser incluído no *kit*.

[00380] Por outro lado, exemplos de reagentes adequados para detecção da proteína TOPK ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma podem incluir anticorpos à proteína TOPK ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal. Além disso, qualquer fragmento ou modificação (por exemplo, anticorpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) do anticorpo pode ser usada como o reagente, contanto que o fragmento ou anticorpo modificado retenha a capacidade de ligação à proteína TOPK ou ao fragmento imunologicamente ativo da mesma. Métodos para preparar estes tipos de anticorpos para a detecção de proteínas são bem conhecidos na técnica e qualquer método pode ser empregado na presente invenção para preparar tais anticorpos e equivalentes dos

mesmos. Além disso, o anticorpo pode ser marcado com moléculas de geração de sinal via a técnica de ligação direta ou marcação indireta. Marcadores e métodos para marcação de anticorpos e detecção da ligação dos anticorpos a seus alvos são bem conhecidos na técnica e quaisquer marcadores e métodos podem ser empregados para a presente invenção. Além disso, mais de um reagente para detecção da proteína TOPK pode ser incluído no *kit*.

[00381] O *kit* pode conter mais de um dos reagentes mencionados antes. O *kit* pode incluir ainda uma matriz sólida e reagente para ligação de uma sonda contra um gene de TOPK ou anticorpo contra um peptídeo de TOPK, um meio e recipiente para cultura de células, reagentes de controle positivo e negativo e um anticorpo secundário para detecção de um anticorpo contra um peptídeo de TOPK. Por exemplo, amostras teciduais obtidas de indivíduos sem câncer ou que sofrem de câncer podem servir como reagentes de controle úteis. Um *kit* da presente invenção pode incluir ainda outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas (por exemplo, escritas, fita, CD-ROM, etc.) com instruções para uso. Estes reagentes e similares podem estar contidos em um recipiente com um rótulo. Recipientes adequados incluem garrafas, frascos e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico.

[00382] Em uma modalidade da presente invenção, quando o reagente é uma sonda contra o mRNA de TOPK, o reagente pode ser imobilizado sobre uma matriz sólida, tal como um tira porosa, para formar pelo menos um sítio de detecção. A região de medição ou detecção da tira porosa pode incluir uma pluralidade de sítios, cada um contendo um ácido nucleico (sonda). Uma tira de teste pode conter também sítios para controles negativos e/ou positivos. Alternativamente, sítios de controle podem estar localizados sobre uma tira distinta da

tira de teste. Opcionalmente, os diferentes sítios de detecção podem conter diferentes quantidades de ácidos nucleicos imobilizados, isto é, uma maior quantidade no primeiro sítio de detecção e quantidades menores em sítios subsequentes. Quando da adição de uma amostra de teste, o número de sítios que mostram um sinal detectável fornece uma indicação passível de quantificação da quantidade de mRNA de TOPK presente na amostra. Os sítios de detecção podem ser configurados em qualquer formato adequadamente detectável e estão, tipicamente, no formato de uma barra ou ponto que cobre a largura de uma tira de teste.

[00383] O *kit* da presente invenção pode incluir ainda uma amostra de controle positivo ou amostra padrão de TOPK. A amostra de controle positivo da presente invenção pode ser preparada por meio de coleta de amostras positivas para TOPK e, então, ensaiando seus níveis de TOPK. Alternativamente, uma proteína ou polinucleotídeo de TOPK purificado pode ser adicionado às células que não expressam TOPK para formar a amostra positiva ou a amostra padrão de TOPK. Na presente invenção, TOPK purificada pode ser uma proteína recombinante. O nível de TOPK da amostra de controle positivo é, por exemplo, maior do que valor de corte.

[00384] Em uma modalidade, a presente invenção fornece ainda um *kit* diagnóstico que inclui uma proteína ou uma proteína parcial da mesma reconhecida especificamente pelo anticorpo da presente invenção ou o fragmento do mesmo.

[00385] Exemplos do peptídeo parcial da proteína da presente invenção incluem polipeptídeos compostos de pelo menos 8, de preferência 15 e, mais preferivelmente, 20 aminoácidos contíguos na sequência de aminoácidos da proteína da presente invenção. Câncer pode ser diagnosticado por meio de detecção de um anticorpo em uma amostra (por exemplo, sangue, tecido) usando uma proteína ou um

peptídeo (polipeptídeo) da presente invenção. O método para preparo da proteína e peptídeos da presente invenção é conforme descrito acima.

[00386] Os métodos para diagnóstico de câncer da presente invenção podem ser realizados determinando-se a diferença entre a quantidade de anticorpo antiTOPK e aquela na amostra de controle correspondente, conforme descrito acima. Se suspeita que o indivíduo está sofrendo de câncer se as amostras células ou tecidos do indivíduo contêm anticorpos contra os produtos de expressão (TOPK) do gene e se determina que a quantidade do anticorpo antiTOPK é maior do que o valor de corte no nível comparado com aquele no controle normal.

[00387] Em outra modalidade, um *kit* diagnóstico da presente invenção pode incluir o peptídeo da presente invenção e uma molécula do HLA que se liga ao mesmo. O método para detecção de CTLs específicos para o antígeno usando peptídeos antigênicos e moléculas do HLA já foi estabelecido (por exemplo, Altman JD *et al.*, *Science* 1996, 274(5284): 94-6). Assim, o complexo do peptídeo da presente invenção e a molécula do HLA podem ser aplicados ao método de detecção para detectar CTLs específicos para o antígeno tumoral, deste modo, permitindo detecção mais precoce de recorrência e/ou metástase de câncer. Ainda, ele pode ser empregado para a seleção de indivíduos aplicáveis com os produtos farmacêuticos que incluem o peptídeo da presente invenção como um ingrediente ativo ou a avaliação do efeito de tratamento dos produtos farmacêuticos.

[00388] Particularmente, de acordo com o método conhecido (vide, por exemplo, Altman JD *et al.*, *Science* 1996, 274(5284): 94-6), o complexo oligomérico, tal como um tetrâmero, da molécula de HLA radio-marcada e o peptídeo da presente invenção pode ser preparado. Com o uso do complexo, o diagnóstico pode ser feito, por exemplo, por meio de quantificação dos CTLs específicos para o peptídeo antigêni-

co nos linfócitos de sangue periférico derivados do indivíduo que se suspeita estar sofrendo de câncer.

[00389] A presente invenção fornece ainda métodos e agentes diagnósticos para avaliação da resposta imunológica do indivíduo usando peptídeos epitópicos, conforme descrito aqui. Em uma modalidade da invenção, peptídeos restritos ao HLA-A24 ou HLA-A2, conforme descrito aqui, podem ser usados como reagentes para avaliação ou prevenção de uma resposta imune de um indivíduo. A resposta imune a ser avaliada é induzida por meio de contato de um imunogênio com células imunocompetentes *in vitro* ou *in vivo*. Em modalidades preferidas, as células imunocompetentes para avaliação de uma resposta imunológica podem ser selecionadas dentre sangue periférico, linfócito de sangue periférico (Peripheral Blood Lymphocyte - PBL) e célula mononuclear de sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC). Métodos para coleta ou isolamento de tais células imunocompetentes são bem conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, qualquer agente que possa resultar na produção de CTLs específicos para antígeno que reconhecem e se ligam ao(s) peptídeo(s) epitópico(s) pode ser empregado como o reagente. O reagente peptídico pode não precisar ser usado como o imunogênio. Sistemas de ensaio que são usados para tal análise incluem desenvolvimentos técnicos relativamente recentes, tais como tetrâmeros, coloração para linfocinas intracelulares e ensaios de liberação de interferon, ou análises ELISPOT. Em uma modalidade preferida, células imunocompetentes a serem contatadas com o reagente peptídico podem ser células que apresentam antígeno, incluindo células dendríticas.

[00390] Por exemplo, os peptídeos da presente invenção podem ser usados em ensaios de coloração de tetrâmero para avaliar células mononucleares de sangue periférico quanto à presença de CTLs específicos para o antígeno após exposição a um antígeno de célula tu-

morosa ou um imunogênio. O complexo tetramérico de HLA pode ser usado para visualizar diretamente CTLs específicos para o antígeno (vide, por exemplo, Ogg *et al.*, *Science* 279: 2103-2106, 1998; e Altman *et al.*, *Science* 174: 94-96, 1996) e determinar a frequência da população de CTL específica para o antígeno em uma amostra de células mononucleares de sangue periférico. Um reagente tetramérico usando um peptídeo da invenção pode ser gerado conforme descrito abaixo.

[00391] Um peptídeo que se liga a uma molécula do HLA é dobrado novamente na presença da cadeia pesada de HLA correspondente e beta-2-microglobulina para gerar um complexo trimolecular. No complexo, o carbóxi término da cadeia pesada é biotinilado em um sítio que foi previamente manipulado na proteína. Então, estreptavidina é adicionada ao complexo para formar o tetrâmero composto do complexo trimolecular e estreptavidina. Pela estreptavidina fluorescentemente marcada, o tetrâmero pode ser usado para corar células específicas para o antígeno. As células podem, então, ser identificadas, por exemplo, através de citometria de fluxo. Tal análise pode ser usada para fins diagnósticos ou prognósticos. Células identificadas por meio do procedimento podem ser usadas também para fins terapêuticos.

[00392] A presente invenção fornece também reagentes para avaliar respostas de *recall* (vide, por exemplo, Bertoni *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100: 503-513, 1997 e Penna *et al.*, *J Exp. Med.* 174: 1565-1570, 1991) incluindo peptídeos da presente invenção. Por exemplo, amostras de PBMC obtidas de pacientes com um câncer a ser tratado são analisadas quanto à presença de CTLs específicos para o antígeno usando peptídeos específicos. Uma amostra de sangue que contém células mononucleares pode ser avaliada por meio de cultura das PBMCs e estimulação das células com um peptídeo da invenção. Após um período apropriado de cultura, a população de células expandida pode ser

analisada, por exemplo, quanto à atividade de CTL.

[00393] Os peptídeos podem também ser usados também como reagentes para avaliar a eficácia de uma vacina. PBMCs obtidas de um paciente vacinado com um imunogênio podem ser analisadas usando, por exemplo, qualquer um dos métodos descritos acima. O paciente sofre tipagem de HLA e reagentes de epítipo peptídico que reconhecem as moléculas específicas para alelo presentes neste paciente são selecionados para análise. A imunogenicidade da vacina pode ser indicada pela presença de CTLs específicos para epítipo na amostra de PBMC.

[00394] Os peptídeos da invenção podem também ser usados para produzir anticorpos, usando técnicas bem conhecidas no campo (vide, por exemplo, "CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY", Wiley/Greene, NY; e "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow e Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), os quais podem ser úteis como reagentes para diagnosticar ou monitorar câncer. Tais anticorpos podem incluir aqueles que reconhecem um peptídeo no contexto de uma molécula do HLA, isto é, anticorpos que se ligam a um complexo de peptídeo-MHC.

[00395] Os peptídeos e composições da presente invenção têm uma série de usos adicionais, alguns dos quais estão descritos aqui. Por exemplo, a presente invenção fornece um método para diagnóstico ou detecção de um distúrbio caracterizado por expressão de um polipeptídeo imunogênico de TOPK. Estes métodos envolvem determinação da expressão de um peptídeo de TOPK que se liga ao HLA ou um complexo de um peptídeo de TOPK que se liga ao HLA e uma molécula da classe I do HLA em uma amostra biológica. A expressão de um peptídeo ou complexo de peptídeo e molécula da classe I do HLA pode ser determinada ou detectada ensaiando com um parceiro de ligação para o peptídeo ou complexo. Em uma modalidade preferi-

da, um parceiro de ligação para o peptídeo ou complexo é um anticorpo que reconhece e se liga especificamente ao peptídeo. A expressão de TOPK em uma amostra biológica, tal como uma biópsia de tumor, pode ser testada por meio de protocolos padrão de amplificação por PCR usando iniciadores de TOPK. Um exemplo de expressão em tumor é apresentado aqui e divulgação adicional de condições e iniciadores exemplificativos para amplificação de TOPK pode ser encontrada no documento WO 2003/27322.

[00396] De preferência, os métodos diagnósticos envolvem contato de uma amostra biológica isolada de um indivíduo com um agente específico para o peptídeo de TOPK que se liga ao HLA para detectar a presença do peptídeo de TOPK que se liga ao HLA na amostra biológica. Conforme usado aqui, "contato" significa colocação da amostra biológica em proximidade suficiente com o agente e sob as condições apropriadas, por exemplo, de concentração, temperatura, tempo, intensidade iônica, para permitir a interação específica entre o agente e o peptídeo de TOPK que se liga ao HLA que estão presentes na amostra biológica. Em geral, as condições para contato do agente com a amostra biológica são condições conhecidas por aqueles versados na técnica para facilitar uma interação específica entre uma molécula e seu cognato (por exemplo, uma proteína e seu receptor cognato, um anticorpo e seu antígeno proteináceo cognato, um ácido nucleico e sua sequência complementar cognata) em uma amostra biológica. Condições ótimas para facilitar uma interação específica entre uma molécula e seu cognato estão descritas na Patente US No. 5.108.921, emitida para Low *et al.*

[00397] O método diagnóstico da presente invenção pode ser realizado *in vivo* e *in vitro*. Consequentemente, a amostra biológica pode estar localizada *in vivo* ou *in vitro* na presente invenção. Por exemplo, a amostra biológica pode ser um tecido *in vivo* e o agente específico

para o polipeptídeo imunogênico de TOPK pode ser usado para detectar a presença de tais moléculas no tecido. Alternativamente, a amostra biológica pode ser coletada ou isolada *in vitro* (por exemplo, uma amostra de sangue, biópsia de tumor, extrato tecidual). Em uma modalidade particularmente preferida, a amostra biológica pode ser uma amostra que contém células, mais preferivelmente uma amostra que contém células tumorosas coletadas de um indivíduo a ser diagnosticado ou tratado.

[00398] Alternativamente, o diagnóstico pode ser feito por meio de um método o qual permite a quantificação direta de células T específicas para o antígeno através de coloração com complexos multiméricos de HLA marcados com fluoresceína (por exemplo, Altman, J. D. *et al.*, 1996, *Science* 274: 94; Altman, J. D. *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10330). Coloração para linfocinas intracelulares e ensaios de liberação de interferon-gama ou ensaios ELISPOT também foram fornecidos. Coloração com tetrâmero, coloração com linfocina intracelular e ensaios ELISPOT parecem ser todos pelo menos 10 vezes mais sensíveis do que ensaios mais convencionais (Murali-Krishna, K. *et al.*, 1998, *Immunity* 8: 177; Lalvani, A. *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 859; Dunbar, P. R. *et al.*, 1998, *Curr. Biol.* 8: 413). Pentâmeros (por exemplo, documento US 2004-209295A), dextrâmeros (por exemplo, documento WO 02/072631) e estreptâmeros (por exemplo, *Nature medicine* 6. 631-637 (2002)) também podem ser usados.

[00399] Por exemplo, em algumas modalidades, a presente invenção fornece um método para diagnóstico ou avaliação de uma resposta imunológica de um indivíduo ao qual foi administrado pelo menos um peptídeo de TOPK da presente invenção, o método incluindo as etapas de:

[00400] contato de um imunogênio com células imunocompetentes sob a condição apropriada para indução de CTL específico para o

imunogênio;

[00401] detecção ou determinação do nível de indução do CTL induzido na etapa (a); e

[00402] correlação da resposta imunológica de um indivíduo com o nível de indução de CTL.

[00403] No contexto da presente invenção, o imunogênio inclui, de preferência, pelo menos um de (a) um peptídeo de TOPK selecionado dentre as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84, peptídeos tendo tais sequências de aminoácidos e peptídeos nos quais tais sequências de aminoácidos tenham sido modificadas com 1, 2 ou mais substituições de aminoácidos. Ao mesmo tempo, condições adequadas de indução de CTL específico para o imunogênio são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, células imunocompetentes podem ser cultivadas *in vitro* sob a presença de imunogênio(s) para induzir a CTL específico para o(s) imunogênio(s). De forma a induzir a CTLs específicos para o imunogênio, quaisquer fatores de estimulação podem ser adicionados à cultura de células. Por exemplo, IL-2 é um fator de estimulação preferível para a indução de CTLs.

[00404] Em algumas modalidades, a etapa de monitoramento ou avaliação de resposta imunológica de um indivíduo a ser tratado com terapia peptídica para câncer pode ser realizada antes, durante e/ou após o tratamento. Em geral, durante um protocolo de terapia de câncer, peptídeos imunogênicos são administrados repetidamente a um indivíduo a ser tratado. Por exemplo, peptídeos imunogênicos podem ser administrados a cada semana durante 3-10 semanas. Consequentemente, a resposta imunológica do indivíduo pode ser avaliada ou monitorada durante o protocolo de terapia de câncer. Alternativamente, a etapa de avaliação ou monitoramento de resposta imunológica à terapia de câncer pode ser no final do protocolo de terapia.

[00405] De acordo com a presente invenção, indução intensificada

de CTL específico para imunogênio quando comparado com um controle indica que o indivíduo a ser avaliado ou diagnosticado respondeu imunologicamente ao(s) imunogênio(s) que foi/foram administrado(s). Controles apropriados para avaliação da resposta imunológica podem incluir, por exemplo, um nível de indução de CTL quando as células imunocompetentes não são contatadas com peptídeo ou peptídeo(s) de controle tendo outras sequências de aminoácidos que não quaisquer peptídeos de TOPK (por exemplo, sequência de aminoácidos aleatória). Em uma modalidade preferida, a resposta imunológica do indivíduo é avaliada de uma maneira específica para sequência, comparando com uma resposta imunológica entre cada imunogênio administrado ao indivíduo. Em particular, mesmo quando uma mistura de alguns tipos de peptídeos de TOPK é administrada ao indivíduo, a resposta imunológica poderia variar, dependendo dos peptídeos. Neste caso, através de comparação da resposta imunológica entre cada peptídeo, peptídeos aos quais o indivíduo mostra maior resposta podem ser identificados.

XII. Anticorpos

[00406] A presente invenção fornece ainda anticorpos que se ligam aos peptídeos da presente invenção. Anticorpos preferidos se ligam especificamente aos peptídeos da presente invenção e não se ligarão (ou se ligarão fracamente) a outros peptídeos. Alternativamente, anticorpos podem se ligar aos peptídeos da invenção, bem como homólogos dos mesmos. Anticorpos contra aos peptídeos da invenção podem encontrar uso em ensaios diagnósticos e prognósticos, bem como metodologias de formação de imagem. Similarmente, tais anticorpos podem encontrar uso no tratamento, diagnóstico e/ou prognóstico de outros cânceres, até o ponto em que TOPK também seja expressa ou superexpressa no paciente com um câncer. Além disso, anticorpos expressos de forma intracelular (por exemplo, anticorpos de cadeia

única) podem encontrar uso terapêuticamente no tratamento de cânceres nos quais a expressão de TOPK está envolvida, exemplos dos quais incluem, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colorretal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[00407] A presente invenção fornece também vários ensaios imunológicos para a detecção e/ou quantificação da proteína TOPK (SEQ ID NO: 86) ou fragmentos da mesma, incluindo polipeptídeos tendo sequências de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84. Tais ensaios podem incluir um ou mais anticorpos antiTOPK capazes de reconhecimento e ligação a uma proteína TOPK ou fragmentos da mesma, conforme apropriado. No contexto da presente invenção, anticorpos antiTOPK que se ligam ao polipeptídeo de TOPK reconhecem, de preferência, um polipeptídeo tendo sequências de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84, de preferência até a exclusão de outros peptídeos. A especificidade de ligação de anticorpo pode ser confirmada por meio de um teste de inibição. Isto é, quando a ligação entre um anticorpo a ser analisado e o polipeptídeo de TOPK de comprimento total é inibida sob a presença de quaisquer fragmentos de polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84, considera-se que este anticorpo se liga especificamente ao fragmento. No contexto da presente invenção, tais ensaios imunológicos são realizados dentro de vários formatos de ensaios imunológicos bem conhecidos na técnica incluindo, porém sem limitações, vários tipos de radioimunoensaios, técnica de imunocromatografia, ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes ligados à enzima (ELIFA) e similares.

[00408] Ensaios imunológicos relacionados, porém sem anticorpo,

da invenção podem incluir também ensaios de imunogenicidade de células T (inibitórios ou estimulatórios), bem como ensaios de ligação ao MHC. Além disso, a presente invenção considera métodos de formação de imagem imunológicos capazes de detecção de cânceres que expressam TOPK, exemplos dos quais incluem, porém sem limitações, métodos de formação de imagem radiocintográficos usando anticorpos marcados da presente invenção. Tais ensaios encontram uso clínico na detecção, monitoramento e prognóstico de cânceres que expressam TOPK, exemplos dos quais incluem, porém sem limitações, AML, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, NSCLC, linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, SCLC e tumor de tecidos moles.

[00409] A presente invenção fornece também anticorpos que se ligam aos peptídeos da invenção. Um anticorpo da invenção pode ser usado em qualquer forma, por exemplo, como um anticorpo monoclonal ou policlonal, e inclui antissoro obtido por meio de imunização de um animal, tal como um coelho, com o peptídeo da invenção, todas as classes de anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos humanos e anticorpos humanizados produzidos por meio de recombinação genética.

[00410] Um peptídeo da invenção usado como um antígeno para obter um anticorpo pode ser derivado de qualquer espécie animal, mas, de preferência, é derivado de um mamífero, tal como um ser humano, camundongo ou rato, mais preferivelmente de um ser humano. Um peptídeo derivado de ser humano pode ser obtido a partir das sequências de nucleotídeos ou aminoácidos descritas aqui.

[00411] De acordo com a presente invenção, peptídeos parciais e completos de uma proteína podem servir como antígenos de imunização. Exemplos de peptídeos parciais adequados incluem, por exem-

plo, o fragmento amino (N)-terminal ou carbóxi (C)-terminal de um peptídeo da presente invenção.

[00412] Aqui, um anticorpo é definido como uma proteína que reage com um peptídeo de TOPK de comprimento inteiro ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade preferida, um anticorpo da presente invenção pode reconhecer fragmentos de peptídeos de TOPK que têm uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 a 40 e 42 a 84. Métodos para síntese de oligopeptídeo são bem conhecidos na técnica. Após a síntese, peptídeos podem ser opcionalmente purificados antes de uso como um imunogênio. No contexto da presente invenção, o oligopeptídeo (por exemplo, 9 ou 10 meros) pode ser conjugado ou ligado com veículos para intensificar a imunogenicidade. Hemocianina do caramujo *Megathura crenulata* (KLH) é bem conhecida como o veículo. O método para conjugação de KLH e peptídeo também é bem conhecidos nas técnicas.

[00413] Alternativamente, um gene que codifica um peptídeo da invenção ou fragmento do mesmo pode ser inserido em um vetor de expressão conhecido o qual é, então, usado para transformar uma célula hospedeira conforme descrito aqui. O peptídeo desejado ou fragmento do mesmo pode ser recuperado do exterior ou interior de células hospedeiras por meio de qualquer método padrão e pode ser subsequentemente usado como um antígeno. Alternativamente, células inteiras que expressam o peptídeo ou seus lisatos ou um peptídeo quimicamente sintetizado podem ser usadas como o antígeno.

[00414] Qualquer animal mamífero pode ser imunizado com o antígeno embora, de preferência, a compatibilidade com células parentais usadas para fusão celular é levada em consideração. Em geral, animais de *Rodentia*, *Lagomorpha* ou *Primates* podem ser usados. Animais da família *Rodentia* incluem, por exemplo, camundongo, rato e porquinho-da-índia. Animais da família *Lagomorpha* incluem, por

exemplo, coelho. Animais da família *Primates* incluem, por exemplo, um macaco de Catarrhini (macaco do Velho Mundo), tal como *Macaca fascicularis*, macaco rhesus, babuíno sagrado e chimpanzés.

[00415] Métodos para imunização de animais com antígenos são conhecidos na técnica. Injeção intraperitoneal ou injeção subcutânea de antígenos é um método padrão para a imunização de mamíferos. Mais especificamente, antígenos podem ser diluídos e suspensos em uma quantidade apropriada de solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline - PBS), solução salina fisiológica, etc. Se desejado, a suspensão de antígeno pode ser misturada com uma quantidade apropriada de um adjuvante padrão, tal como adjuvante completo de Freund, transformada em emulsão e, então, administrada a animais mamíferos. De preferência, isto é seguido por várias administrações de antígeno misturado com uma quantidade apropriada de adjuvante incompleto de Freund a cada 4 a 21 dias. Um veículo apropriado também pode ser usado para imunização. Após imunização conforme acima, o soro pode ser examinado, por meio de um método padrão, quanto a um aumento na quantidade de anticorpos desejados.

[00416] Anticorpos policlonais contra os peptídeos da presente invenção podem ser preparados por meio de coleta de sangue do mamífero imunizado examinado quanto ao aumento de anticorpos desejados no soro e separação do soro do sangue através de qualquer método convencional. Anticorpos policlonais podem incluir soro que contém os anticorpos policlonais, bem como a fração que contém os anticorpos policlonais pode ser isolada do soro. Imunoglobulina G ou M pode ser preparada a partir de uma fração a qual reconhece apenas o peptídeo da presente invenção usando, por exemplo, uma coluna de afinidade acoplada com o peptídeo da presente invenção e purificando adicionalmente esta fração usando coluna de proteína A ou proteína G.

[00417] Para preparar anticorpos monoclonais para uso no contexto

da presente invenção, células imunes são coletadas do mamífero imunizado com o antígeno e verificadas quanto ao nível aumentado de anticorpos desejados no soro conforme descrito acima e são submetidas à fusão celular. As células imunes usadas para fusão celular podem, de preferência, ser obtidas do baço. Outras células parentais preferidas a serem fundidas com o imunócito acima incluem, por exemplo, células de mieloma de mamíferos e, mais preferivelmente, células de mieloma que têm uma propriedade adquirida para a seleção de células fundidas por fármacos.

[00418] As células de imunócito e mieloma acima podem ser fundidas de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, o método de Milstein *et al.* (Galfre e Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

[00419] Os hibridomas resultantes obtidos por meio da fusão celular podem ser selecionados cultivando os mesmos em um meio de seleção padrão, tal como meio HAT (meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina). A cultura de células é, tipicamente, continuada no meio HAT durante vários dias até várias semanas, o tempo sendo suficiente para permitir que todas as outras células, com a exceção do hibridoma desejado (células não fundidas), morram. Então, a diluição limitativa padrão pode ser realizada para triagem e clonagem da célula que produz o anticorpo desejado.

[00420] Além do método acima, em que um animal não humano é imunizado com um antígeno para preparo de hibridoma, linfócitos humanos, tais como aqueles infectados pelo vírus EB, podem ser imunizados com um peptídeo, células que expressam o peptídeo ou seus lisatos *in vitro*. Então, os linfócitos imunizados podem ser fundidos com células de mieloma derivadas de seres humanos que são capazes de divisão indefinidamente, tal como U266, para proporcionar um hibridoma que produz um anticorpo humano desejado que é capaz de se ligar ao peptídeo (Pedido de Patente Japonês Publicado Não Exami-

nado nº Sho 63-17688).

[00421] Os hibridomas obtidos podem, então, ser subsequentemente transplantados para a cavidade abdominal de um camundongo e as ascitas extraídas. Os anticorpos monoclonais obtidos podem ser purificados, por exemplo, por meio de precipitação com sulfato de amônio, uma coluna de proteína A ou proteína G, cromatografia de troca iônica DEAE ou uma coluna de afinidade à qual o peptídeo da presente invenção está acoplado. Um anticorpo da presente invenção pode ser usado não apenas para purificação e detecção de um peptídeo da presente invenção, mas também como um candidato para agonistas e antagonistas de um peptídeo da presente invenção.

[00422] Alternativamente, uma célula imune, tal como um linfócito imunizado, que produz anticorpos pode ser imortalizada por um oncogene e usada para preparo de anticorpos monoclonais.

[00423] Anticorpos monoclonais assim obtidos podem ser também preparados recombinantemente usando técnicas de engenharia genética (vide, por exemplo, Borrebaeck e Larrick, "Therapeutic Monoclonal Antibodies", publicado no Reino Unido por MacMillan Publishers LTDA. (1990)). Por exemplo, um DNA que codifica um anticorpo pode ser clonado a partir de uma célula imune, tal como um hibridoma ou um linfócito imunizado que produz o anticorpo, inserido em um vetor apropriado e introduzido em células hospedeiras para preparar um anticorpo recombinante. A presente invenção fornece também anticorpos recombinantes preparados conforme descrito acima.

[00424] Um anticorpo da presente invenção pode ser um fragmento de um anticorpo ou anticorpo modificado, contanto que ele se ligue a um ou mais dos peptídeos da invenção. Por exemplo, o fragmento de anticorpo pode ser Fab, F(ab')₂, Fv ou Fv de cadeia única (scFv), no qual fragmentos Fv de cadeias H e L são ligados por um ligante apropriado (Huston *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)).

Mais especificamente, um fragmento de anticorpo pode ser gerado por meio de tratamento de um anticorpo com uma enzima, tal como papaína ou pepsina. Alternativamente, um gene que codifica o fragmento de anticorpo pode ser construído, inserido em um vetor de expressão e expresso em uma célula hospedeira apropriada (vide, por exemplo, Co *et al.*, *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better e Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun e Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux *et al.*, *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird e Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

[00425] Um anticorpo pode ser modificado por meio de conjugação com uma variedade de moléculas, tal como polietileno glicol (PEG). A presente invenção fornece tais anticorpos modificados. O anticorpo modificado pode ser obtido por meio de modificação química de um anticorpo. Estes métodos de modificação são convencionais no campo.

[00426] Alternativamente, um anticorpo da presente invenção pode ser obtido como um anticorpo quimérico, entre uma região variável derivada de anticorpo não humano e a região constante derivada de anticorpo humano ou como um anticorpo humanizado, incluindo a região de determinação de complementaridade (Complementarity Determining Region - CDR) derivada de anticorpo não humano, a região de *framework* (FR) e a região constante derivada de anticorpo humano. Tais anticorpos podem ser preparados acordo com tecnologia conhecida. Humanização pode ser realizada substituindo CDRs ou sequências de CDRs de roedor pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano (vide, por exemplo, Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988)). Consequentemente, tais anticorpos humanizados são anticorpos quiméricos, em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana.

[00427] Anticorpos completamente humanos incluindo regiões variáveis humanas, além das regiões de *framework* e constante humanas, também podem ser usados. Tais anticorpos podem ser produzidos usando várias técnicas conhecidas no campo. Por exemplo, métodos *in vitro* envolvem o uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticorpo humano visualizadas sobre bacteriófagos (por exemplo, Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991)). Similarmente, anticorpos humanos podem ser produzidos introduzindo *loci* de imunoglobulinas humanas em animais transgênicos, por exemplo, camundongos, nos quais os genes de imunoglobulina endógenos tenham sido parcial ou completamente inativados. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes US Nos. US 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

[00428] Anticorpos obtidos conforme acima pode ser purificados até a homogeneidade. Por exemplo, a separação e purificação do anticorpo podem ser realizadas de acordo com os métodos de separação e purificação usados para proteínas em geral. Por exemplo, o anticorpo pode ser apropriadamente separado e isolado mediante uso selecionado e combinado de cromatografias em coluna, tais como cromatografia de afinidade, filtração, ultrafiltração, dessalinização, diálise, eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e focalização isoelétrica ("Antibodies: A Laboratory Manual", Ed Harlow e David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), porém sem limitações aos mesmos. Uma coluna de proteína A e coluna de proteína G podem ser usadas como a coluna de afinidade. Colunas de proteína A exemplificativas a serem usadas incluem, por exemplo, Hyper D, POROS e Sepharose F.F. (Pharmacia).

[00429] Exemplos de técnicas cromatográficas adequadas, exceto cromatografia de afinidade incluem, por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, filtração em gel, cromatografia

em fase reversa, cromatografia de adsorção e similares ("Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual", Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Os procedimentos cromatográficos podem ser conduzidos por meio de cromatografia em fase líquida, tal como HPLC e FPLC.

[00430] Por exemplo, medição de absorbância, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), imunoensaio enzimático (EIA), radioimunoensaio (RIA) e/ou imunofluorescência podem ser usados para medir a atividade de ligação a antígeno do anticorpo da invenção. Em ELISA, o anticorpo da presente invenção é imobilizado sobre uma lâmina, um peptídeo da invenção é aplicado à lamina e, então, uma amostra contendo um anticorpo desejado, tal como sobrenadante de cultura de células que produzem anticorpo ou anticorpos purificados, é aplicada. Então, um anticorpo secundário que reconhece o anticorpo primário e é marcado com uma enzima, tal como fosfatase alcalina, é aplicado e a lâmina é incubada. Em seguida, após lavagem, um substrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenila, é adicionado à lâmina e a absorbância é medida para avaliar a atividade de ligação a antígeno da amostra. Um fragmento do peptídeo, tal como um fragmento C-terminal ou N-terminal, pode ser usado como o antígeno para avaliar a atividade de ligação do anticorpo. BIAcore (Pharmacia) pode ser usado para avaliar a atividade do anticorpo de acordo com a presente invenção.

[00431] Os métodos acima permitem a detecção ou medição de um peptídeo da invenção mediante exposição de um anticorpo da invenção a uma amostra que se presume conter um peptídeo da invenção e detecção ou medição do complexo imune formado pelo anticorpo e o peptídeo.

[00432] Em virtude do fato de que o método de detecção ou medição do peptídeo de acordo com a invenção pode detectar ou medir

especificamente um peptídeo, o método pode encontrar uso em uma variedade de experimentos nos quais o peptídeo é usado.

XIII. Vetores e Células Hospedeiras

[00433] A presente invenção fornece também vetores e células hospedeiras nos quais um nucleotídeo que codifica um peptídeo da presente invenção é introduzido. Um vetor da presente invenção encontra utilidade como um veículo de nucleotídeos, especialmente um DNA, da presente invenção em célula hospedeira, para expressar um peptídeo da presente invenção ou administrar um nucleotídeo da presente invenção para terapia gênica.

[00434] Quando *E. coli* é selecionada como a célula hospedeira e o vetor é amplificado e produzido em uma grande quantidade em *E. coli* (por exemplo, JM109, DH5 alfa, HB101 ou XL1Blue), o vetor deverá ter uma "ori" adequada para amplificação em *E. coli* e um gene marcador adequado para seleção de *E. coli* transformada (por exemplo, um gene de resistência a fármacos selecionado por um fármaco, tal como ampicilina, tetraciclina, canamicina, cloranfenicol ou similar). Por exemplo, vetores da série M13, vetores da série pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc., podem ser usados. Além disso, pGEM-T, pDIRECT e pT7 também podem ser usados para subclonagem e extração de cDNA, bem como os vetores descritos acima. Quando um vetor é usado para produzir a proteína da presente invenção, um vetor de expressão pode encontrar uso. Por exemplo, um vetor de expressão a ser expresso em *E. coli* deverá ter as características acima para ser amplificado em *E. coli*. Quando *E. coli*, tal como JM109, DH5 alfa, HB101 ou XL1 Blue, é usada como uma célula hospedeira, o vetor deverá ter um promotor, por exemplo, promotor lacZ (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-6 (1989); *FASEB J* 6: 2422-7 (1992)), promotor araB (Better *et al.*, *Science* 240: 1041-3 (1988)), promotor T7 ou similar, que podem expressar eficientemente o gene desejado em *E. coli*. A este respeito,

pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress System" (Qiagen), pEGFP e pET (neste caso, o hospedeiro é, de preferência, BL21, o qual expressa RNA polimerase T7), por exemplo, podem ser usados em vez dos vetores acima. Adicionalmente, o vetor pode conter também uma sequência sinalizadora para secreção de peptídeo. Uma sequência sinalizadora exemplificativa que direciona o peptídeo a ser secretado para o periplasma de *E. coli* é a sequência sinalizadora pelB (Lei *et al.*, *J Bacteriol* 169: 4379 (1987)). Meios para introdução dos vetores nas células hospedeiras alvo incluem, por exemplo, o método com cloreto de cálcio e o método de eletroporação.

[00435] Além de *E. coli*, por exemplo, vetores de expressão derivados de mamíferos (por exemplo, pcDNA3 (Invitrogen) e pEGF-BOS (*Nucleic Acids Res* 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vetores de expressão derivados de células de insetos (por exemplo, "Bac-To-BAC Baculovirus Expression System" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vetores de expressão derivados de plantas (por exemplo, pMH1, pMH2), vetores de expressão derivados de vírus animais (por exemplo, pHSV, pMV, pAdexLcw), vetores de expressão derivados de retrovírus (por exemplo, pZlpneo), vetor de expressão derivado de levedura (por exemplo, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) e vetores de expressão derivados de *Bacillus subtilis* (por exemplo, pPL608, pKTH50) podem ser usados para produção do polipeptídeo da presente invenção.

[00436] De forma a expressar o vetor em células de animais, tais como células CHO, COS ou NIH3T3, o vetor deverá ter um promotor necessário para expressão em tais células, por exemplo, o promotor SV40 (Mulligan *et al.*, *Nature* 277: 108 (1979)), o promotor MMLV-LTR, o promotor EF1 alfa (Mizushima *et al.*, *Nucleic Acids Res* 18: 5322 (1990)), o promotor CMV e similares e, de preferência, um gene marcador para seleção de transformantes (por exemplo, um gene de resis-

tência a fármaco selecionado por um fármaco (por exemplo, neomicina, G418)). Exemplos de vetores conhecidos com estas características incluem, por exemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV e pOP13.

[00437] Daqui em diante, a presente invenção é descrita em maiores detalhes com referência aos Exemplos. No entanto, embora os materiais, métodos e exemplos a seguir possam servir para ajudar aqueles versados na técnica na fabricação e uso de determinadas modalidades da presente invenção, eles se destinam apenas a ilustrar aspectos da presente invenção e, assim, não limitam de nenhum algum o âmbito da presente invenção. Conforme aqueles versados na técnica reconhecerão facilmente, métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui podem ser usados na prática ou testagem da presente invenção.

Exemplos

Materiais e Métodos

Linhagens de Células

[00438] TISI, uma linhagem de células linfoblastoide HLA-A*2402 positiva, foi adquirida da IHWG Cell and Gene Bank (Seattle, WA). T2, uma linhagem de células B linfoblastoides HLA-A*0201-positiva e COS7, uma linhagem de células de rim de macaco verde Africano, foram adquiridas da ATCC.

Seleção de peptídeos candidatos derivados de TOPK

[00439] Peptídeos de 9 meros e 10 meros derivados de TOPK (Acesso GenBank No. NM_018492; por exemplo, SEQ ID No: 85) que se ligam a qualquer um ou ambos de uma molécula de HLA-A*2402 e HLA-A*0201, foram previstos usando o servidor de previsão de ligação "NetMHC3.0" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus *et al.* (Tissue Antigens., Novembro de 2003, 62(5): 378-84, 2003), Nielsen *et al.* (Protein Sci., Maio de 2003, 12(5): 1007-17, Bioinformatics, 12 de

Junho de 2004, 20(9): 1388-97)). Estes peptídeos foram sintetizados pela Biosynthesis (Lewisville, Texas) de acordo com um método padrão de síntese em fase sólida e purificados por meio de cromatografia de líquido de alto desempenho (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) em fase reversa. A pureza (>90%) e a identidade dos peptídeos foram determinadas por meio de HPLC analítica e análise por espectrometria de massa, respectivamente. Os peptídeos foram dissolvidos em sulfóxido de dimetila a 20 mg/mL e armazenados a -80°C.

Indução de CTLs *in vitro*

[00440] Células dendríticas (Dendritic Cells - DCs) derivadas de monócitos foram usadas como células que apresentam antígeno para induzir à respostas de linfócitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocyte - CTL) contra peptídeos apresentados sobre antígeno leucocitário humano (Human Leukocyte Antigen - HLA). DCs foram geradas *in vitro* conforme descrito alhures (Nakahara S *et al.*, *Cancer Res*, 15 de Julho de 2003, 63(14): 4112-8). Especificamente, células mononucleares de sangue periférico isoladas de um voluntário normal (HLA-A*2402 positivo ou HLA-A*0201 positivo) por meio de solução Ficoll-Paque Plus (Pharmacia) foram separadas pela aderência a um disco de cultura tecidual de plástico (Becton Dickinson) de modo a enriquecê-las como a fração de monócitos. A população enriquecida em monócitos foi cultivada na presença de 1000 U/mL de fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor - GM-CSF) (R&D System) e 1000 U/mL de interleucina (IL)-4 (R&D System) em Meio AIM-V (Invitrogen) contendo soro autólogo (Autologous Serum - AS) termicamente inativado a 2%. Após 7 dias de cultura, as DCs induzidas por citocina receberam um pulso com 20 µg/mL de cada um dos peptídeos sintetizados na presença de 3 µg/mL de beta-2-microglobulina por 3 horas a 37 °C em Meio AIM-V.

As células geradas pareciam expressar moléculas associadas à DC, tais como CD80, CD83, CD86 e classe II do HLA, sobre suas superfícies celulares (dados não mostrados). Estas DCs que receberam pulso com peptídeo foram, então, inativadas por irradiação de raios X (20 Gy) e misturadas em uma proporção de 1:20 com células T CD8+ autólogas, obtidas por meio de seleção positiva com o kit CD8 Positive Isolation (Dynal). Estas culturas foram colocadas em lâminas com 48 cavidades (Corning); cada cavidade contendo $1,5 \times 10^4$ DCs que receberam pulso com peptídeo, 3×10^5 células T CD8+ e 10 ng/mL de IL-7 (R&D System) em 0,5 mL de meio AIM-V/AS a 2%. Três dias depois, estas culturas foram suplementadas com IL-2 (CHIRON) até uma concentração final de 20 UI/mL. Nos Dias 7 e 14, as células T foram estimuladas ainda mais com as DCs autólogas que receberam pulso com peptídeo. As DCs foram preparadas cada vez da mesma maneira descrita acima. CTLs foram testados contra células TISI que receberam pulso com peptide ou células T2 após o 3º ciclo de estimulação com peptídeo no Dia 21 (Tanaka H *et al.*, *Br J Cancer*, 5 de Janeiro de 2001, 84(1): 94-9; Umamo Y *et al.*, *Br J Cancer*, 20 de Abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N *et al.*, *Clin Cancer Res*, 14 de Dezembro de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T *et al.*, *Cancer Sci*, Maio de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T *et al.*, *Cancer Sci*, Agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Procedimento de Expansão de CTL

[00441] CTLs foram expandidos em cultura usando o método similar àquele descrito por Riddell *et al.* (Walter EA *et al.*, *N Engl J Med*, 19 de Outubro de 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR *et al.*, *Nat Med*, Fevereiro de 1996, 2(2): 216-23). Um total de 5×10^4 CTLs foram suspensos em 25 mL de meio AIM-V/AS a 5% com 2 tipos de linhagens de células B linfoblastoides humanas, inativadas por Mitomicina C, na presença de 40 ng/ml de anticorpo monoclonal anti-CD3 (Pharmin-

gen). Um dia após início das culturas, 120 UI/mL de IL-2 foram adicionados às culturas. As culturas foram alimentadas com meio AIM-V/AS a 5% fresco contendo 30 UI/mL de IL-2 nos Dias 5, 8 e 11 (Tanaka H *et al.*, *Br J Cancer*, 5 de Janeiro de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y *et al.*, *Br J Cancer*, 20 de Abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N *et al.*, *Clin Cancer Res*, 15 de Dezembro de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T *et al.*, *Cancer Sci*, Maio de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T *et al.*, *Cancer Sci*, Agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Estabelecimento de clones de CTL

[00442] As diluições foram feitas para obter 0,3, 1, e 3 CTLs/cavidade em lâminas de microtitulação de fundo redondo com 96 cavidades (Nalge Nunc International). CTLs foram cultivados com 1×10^4 células/cavidade de 2 tipos de linhagens de células linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de anticorpo anti-CD3 e 125 U/ml de IL-2 em um total de 150 µL/cavidade de Meio AIM-V contendo AS a 5%. 50 µL/cavidade de IL-2 foram adicionados ao meio 10 dias depois, de modo a atingir uma concentração final de 125 U/ml de IL-2. A atividade de CTL foi testada no 14º dia e clones de CTL foram expandidos usando o mesmo método conforme descrito acima (Uchida N *et al.*, *Clin Cancer Res*, 15 de Dezembro de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T *et al.*, *Cancer Sci*, Maio de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T *et al.*, *Cancer Sci*, Agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Atividade específica de CTL

[00443] Para examinar a atividade específica de CTL, ensaio ELISPOT de IFN-gama e ELISA de IFN-gama foram realizados. Células TISI ou células T2 que receberam pulso com peptídeo (1×10^4 /cavidade) foram preparadas como células estimuladoras. Células cultivadas em uma placa com 48 cavidades, linhagens de CTL e clones de CTL foram usados como células respondedoras. O ensaio ELISPOT de IFN-gama e ELISA de IFN-gama foram realizados se-

gundo o procedimento dos fabricantes.

Estabelecimento das células que expressam forçadamente um ou ambos do gene alvo e HLA-A24 ou HLA-A2

[00444] O cDNA que codifica um quadro de leitura aberta de genes alvo, HLA-A*2402 ou HLA-A*2401 foi amplificado por meio de PCR. O produto amplificado por PCR foi clonado em um vetor de expressão. Os plasmídeos foram transfectados em COS7, a qual é a linhagem de gene alvo nulo, HLA-A*0201-nula e HLA-A*2402-nula usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. Depois de 2 dias após transfecção, as células transfectadas foram coletadas com Versene (Invitrogen) e usadas como as células estimuladoras (5×10^4 células/cavidade) para o ensaio de atividade de CTL.

Capacidade de CTL de reconhecer a linhagem de célula alvo que expressa endogenamente TOPK e HLA-A*2402 ou HLA-A*0201

[00445] O clone de CTL foi examinado quanto à sua capacidade de reconhecer a célula alvo que expressa endogenamente TOPK e HLA-A*2402 ou HLA-A*0201. O clone de CTL estabelecido foi cultivado com linhagens de células alvo (5×10^4 /cavidade) durante a noite. Após incubação, o IFN-gama no meio de cultura foi medido por ELISA. ELISA de IFN-gama foi realizado segundo o procedimento do fabricante.

Resultados

Expressão aumentada de TOPK em cânceres

[00446] Os dados de perfil de expressão gênica amplo obtidos a partir de vários cânceres usando microarranjo de cDNA revelaram que expressão de TOPK (Acesso GenBank N° NM_018492, por exemplo, SEQ ID NO: 85) estava especificamente elevada em tecidos de câncer quando comparado com o tecido normal correspondente. Expressão de TOPK estava validamente elevada em 1 de 15 AML, 15 de 18 cânceres de bexiga, 36 de 40 cânceres de mama, 2 de 6 cânceres cervi-

cais, 6 de 6 carcinomas colangiocelulares, 2 de 6 cânceres colo-retais, 1 de 1 câncer gástrico de tipo difuso, 5 de 5 NSCLCs, 1 de 2 linfomas, 7 de 11 osteossarcomas, 12 de 19 cânceres de próstata, 3 de 12 carcinomas renais, 14 de 14 SCLCs e 15 de 29 tumores de tecido moles (Tabela 1).

Tabela 1

Câncer/Tumor	Proporção
AML	1/15
Câncer de bexiga	15/18
Câncer de mama	36/40
Câncer cervical	2/6
Carcinoma colangiocelular	6/6
Câncer colo-retal	2/6
Câncer gástrico de tipo difuso	1/1
NSCLC	5/5
Linfoma	1/2
Osteossarcoma	7/11
Câncer de próstata	12/19
Carcinoma renal	3/12
SCLC	14/14
Tumor de tecidos moles	15/29

Previsão de peptídeos que se ligam ao HLA-A24 derivados de TOPK

[00447] As Tabelas 2a e 2b mostram a ligação de peptídeos de TOPK de 9 meros e 10 meros na ordem de alta afinidade de ligação ao HLA-A24. Um total de 41 peptídeos tendo capacidade potencial de ligação ao HLA-A0224 foram selecionados e examinados para determinar os peptídeos epitópicos.

Tabela 2a

Peptídeos de 9 meros que se ligam ao HLA-A24 derivados de TOPK

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
289	SYQKVIELF	21	1
230	IFAFGLTLW	363	2

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
130	RYKASQDPF	451	3
237	LWEMMTLSI	1351	4
155	KYLHQEKKL	1906	5
232	AFGLTLWEM	3946	6
174	VIKGDFETI	4496	7
73	HYRSVYQKR	4663	8
235	LTLWEMMTL	4781	9
19	SVLCSTPTI	6522	10
205	CYIGTEPWK	7254	11
77	VYQKRLMDE	8604	12
270	AYYAALGTR	8621	13
58	HSPWAVKKI	9096	14
81	RLMDEAKIL	12527	15
278	RPPINMEEL	19706	16
183	KICDVGVS	25266	17
227	KADIFAFGL	25408	18
13	LSEKKKSVL	26380	19
146	VALNMARGL	26693	20
140	AAILKVAL	28349	21
103	FTEANDGSL	29275	22
105	EANDGSLCL	29821	23
118	GGEKSLNDL	35171	24

Tabela 2b

Peptídeos de 10 meros que se ligam ao HLA-A24 derivados de TOPK

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
31	ASPFMQKLGF	4764	25
155	KYLHQEKLL	8099	26
288	ESYQKVIELF	9466	27
289	SYQKVIELFS	9631	28
130	RYKASQDPFP	9917	29
47	YLMKRSPRGL	10978	30
73	HYRSVYQKRL	11919	31
102	AFTEANDGSL	14375	32

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
39	GFGTGVNVYL	21925	33
4	ISNFKTPSKL	21974	34
77	VYQKRLMDEA	23521	35
241	MTLSIPHINL	27049	36
12	KLSEKKKSVL	28153	37
148	LNMARGLKYL	30397	38
145	KVALNMARGL	32052	39
114	AMEYGGEKSL	32705	40

[00448] Posição inicial indica o número de resíduo de aminoácido do N-terminal de TOPK. A dissociação constante [Kd(nM)] é derivada de "NetMHC 3.0".

Previsão de peptídeos que se ligam ao HLA-A02 derivados de TOPK

[00449] As Tabelas 3a e 3b mostram a ligação de peptídeos de TOPK de 9 meros e 10 meros, respectivamente, na ordem de alta afinidade de ligação ao HLA-A02. Um total de 44 peptídeos tendo capacidade potencial de ligação ao HLA-A02 foram selecionados e examinados para determinar os peptídeos epitópicos.

Tabela 3a

Peptídeos de 9 meros que se ligam ao HLA-A02 derivados de TOPK

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
55	GLSHSPWAV	13	41
240	MMTLSIPHI	37	42
34	FMQKLGFGT	76	43
236	TLWEMMTLS	150	44
19	SVLCSTPTI	230	45
134	SQDPFPAAI	238	46
183	KICDVGVS	415	47
81	RLMDEAKIL	470	48
149	NMARGLKYL	524	49
235	LTLWEMMTL	648	50
12	KLSEKKKSV	775	51

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
227	KADIFAFGL	1542	52
285	ELDESYQKV	1902	53
47	YLMKRSPRG	2476	54
310	SAAHIVEAL	3199	55
132	KASQDPFPA	3496	56
242	TLSIPHINL	3753	57
156	YLHQEKK1.L	4077	58
138	FPAAILKV	4228	59
142	IILKVALNM	4330	60

Tabela 3b

Peptídeos de 10 meros que se ligam ao HLA-A02 derivados de TOPK

Posição inicial	Sequência de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
190	SLPLDENMTV	30	61
236	TLWEMMTLSI	32	62
231	FAFGLTLWEM	41	63
47	YLMKRSPRGL	64	64
234	GLTLWEMMTL	74	65
239	EMMTLSIPHI	93	66
290	YQKVIELFSV	101	67
37	KLGFGTGVNV	192	68
20	VLCSTPTINI	290	69
241	MTLSIPHINL	310	70
272	YAALGTRPPI	1347	71
88	ILKSLHHPNI	1656	72
81	RLMDEAKILK	1720	73
313	HIVEALETDV	2345	74
54	RGLSHSPWAV	2364	75
142	IILKVALNMA	2428	76
35	MQKLGFGTGV	2432	77
110	SECLAMEYGG	3236	78
223	VITDKADIFA	3422	79
274	ALGTRPPINM	3575	80
173	VVIKGFETI	3955	81
141	AHLKVALNM	4247	82
292	KVIELFSVCT	4637	83
180	ETIKICDVG	4911	84

[00450] Posição inicial indica o número de resíduo de aminoácido do N-terminal de TOPK. A dissociação constante [Kd(nM)] é derivada

de "NetMHC 3.0".

Indução de CTL com os peptídeos previstos de TOPK restrito ao HLA-A*2402

[00451] CTLs para aqueles peptídeos derivados de TOPK foram gerados de acordo com os protocolos conforme descrito em "Materiais e Métodos". Atividade específica de CTL para o peptídeo foi detectada por meio do ensaio ELISPOT de IFN-gama (Figura 1). A cavidade número #8 com TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), #3 com TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), #3 com TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), #2 com TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) and #4 com TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e) demonstrou produção potente de IFN-gama quando comparado com as cavidades de controle. Por outro lado, nenhuma atividade específica de CTL foi detectada por meio de estimulação com outros peptídeos mostrados nas Tabelas 2a e 2b, embora estes peptídeos tivessem possível atividade de ligação ao HLA-A*2402. Conforme é típico de dados negativos, nenhuma produção de IFN-gama específica foi observada a partir de CTL estimulado com TOPK-A24-9-289 (SEQ ID NO: 1) (f). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que os 5 peptídeos selecionados derivados de TOPK poderiam induzir a CTLs potentes.

Indução de CTL com peptídeos previstos a partir de TOPK restrito ao HLA-A*0201

[00452] A atividade de CTL específica dos peptídeos foi detectada pelo ensaio ELISPOT de IFN-gama (Figura 2). A cavidade número #7 com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), #4 com TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), #2 com TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47) (c), #8 com TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (d), #4 com TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (e), #3 com TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (f), #3 com TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (g), #5 com TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (h), #3 com TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63)

(i), #8 com TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (j), #1 com TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (k), #1 com TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71) (l), #4 com TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (m) e #4 com TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) (n) demonstrou produção potente de IFN-gama quando comparado com as cavidades de controle. Por outro lado, nenhuma atividade de CTL específica foi detectada por estimulação com outros peptídeos mostrados nas Tabelas 3a e 3b, embora os peptídeos tivessem possível atividade de ligação ao HLA-A*0201. Conforme é típico de dados negativos, nenhuma produção de IFN-gama específica foi observada a partir de CTL estimulado com TOPK-A02-9-55 (SEQ ID NO: 41) (o). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que os 14 peptídeos selecionados derivados de TOPK poderiam induzir a CTLs potentes.

Estabelecimento de linhagem e clone de CTL contra peptídeo derivado de TOPK

[00453] As células na cavidade número #8 com TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), #3 com TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), #3 com TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), #2 com TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) e #4 com TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e) que mostraram atividade de CTL específica de peptídeos através do um ensaio ELISPOT de IFN-gama foram expandidas e estabelecidas nas linhagens de CTL. Atividades de CTL destas linhagens de CTL foram medidas por ELISA de IFN-gama (Figura 3). Linhagens de CTL demonstraram produção potente de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo correspondente quando comparado com as células alvo sem pulso de peptídeo. Além disso, os clones de CTL foram estabelecidos por diluição limitativa a partir das linhagens de CTL, conforme descrito em "Materiais e Métodos", e a produção de IFN-gama a partir dos clones de CTL contra células TISI que receberam um pulso com o peptídeo correspondente foi medida

por ELISA de IFN-gama. Uma produção potente de IFN-gama foi observada a partir dos clones de CTL estimulados com TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (a), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (b) e TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (c) (Figura 4).

[00454] As células na cavidade número #7 com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), #4 com TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), #8 com TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (c), #4 com TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (d), #3 com TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (e), #3 com TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (f), #5 com TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (g), #3 com TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (h), #8 com TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (i), #1 com TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (j) e #4 com TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (k) que mostraram atividade de CTL específica de peptídeos por um ensaio ELISPOT de IFN-gama foram expandidas e estabelecidas em linhagens de CTL. As atividades de CTL destas linhagens de CTL foram medidas pelo ELISA de IFN-gama (Figura 5). Linhagens de CTL demonstraram produção potente de IFN-gama contra células alvo que receberam um pulso com o peptídeo correspondente quando comparado com as células alvo sem pulso de peptídeo. Além disso, os clones de CTL foram estabelecidos por diluição limitativa a partir das linhagens de CTL, conforme descrito em "Materiais e Métodos", e a produção de IFN-gama a partir dos clones de CTL contra células T2 que receberam um pulso com o peptídeo correspondente foi medida por ELISA de IFN-gama. Uma produção potente de IFN-gama foi observada a partir dos clones de CTL estimulados com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a) e TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (b) (Figura 6).

Atividade específica de CTL contra células alvo que expressam TOPK e HLA-A*2402 ou HLA-A*0201

[00455] O clone de CTL estabelecido estimulado contra o peptídeo TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) foi examinado quanto à capacida-

de reconhecer células alvo que expressam TOPK e a molécula de HLA-A*0202. Células COS transfectadas com o TOPK de comprimento completo e o gene de HLA-A*2402 (um modelo específico para as células alvo que expressam TOPK e o gene de HLA-A*2402) foram preparadas como células estimuladoras e células COS7 transfectadas com TOPK de comprimento completo ou HLA-A*2402 foram usadas como os controles. Na Figura 7, o clone de CTL estimulado com TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) mostrou atividade de CTL potente contra células COS7 expressando TOPK e HLA-A*2402. Por outro lado, nenhuma atividade de CTL específica significativa foi detectada contra os controles. Assim, estes dados demonstram claramente que o peptídeo TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) é endogenamente processado e expresso sobre as células alvo, com a molécula de HLA-A*240 e é reconhecido pelo CTL. A linhagem de CTL estabelecida estimulada contra o peptídeo TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) foi examinada quanto à capacidade de reconhecer células alvo que expressam TOPK e a molécula de HLA-A*0201. Células COS7 transfectadas com TOPK de comprimento completo e o gene de HLA-A*0201 (um modelo específico para células alvo que expressam TOPK e o gene de HLA-A*0201) foram preparadas como células estimuladoras e células COS7 transfectadas com TOPK de comprimento completo ou HLA-A*0201 foram usadas como controles. Na Figura 8, a linhagem de CTL estimulada com TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) mostrou uma potente atividade de CTL contra células COS7 que expressam tanto TOPK quanto HLA-A*0201. Por outro lado, nenhuma atividade de CTL específica significativa foi detectada contra os controles. Assim, estes dados demonstram claramente que o peptídeo TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) é endogenamente processado e expresso sobre as células alvo com a molécula de HLA-A*0201 e é reconhecido pelo CTL. Estes resultados indicam que estes peptídeos derivados de TOPK pode es-

tar disponíveis para aplicação em vacinas contra o câncer em pacientes com tumores que expressam TOPK .

Análise de homologia de peptídeos antigênicos

[00456] Os CTLs estimulados com TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27), TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28), TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) ou TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) mostraram atividade de CTL específica e significativa. Este resultado pode ser em virtude do fato de que estas sequências são homólogas ao peptídeo derivado de outras moléculas que são conhecidas por sensibilizar o sistema imune humano. Para excluir esta possibilidade, análises de homologia foram realizadas para esta sequência peptídica usando, como consultas, o algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), o qual não revelou nenhuma sequência com homologia significativa. Os resultados de análises de homologia indicam que a sequência de TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27), TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28), TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID

NO: 66), TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) e TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) são singulares e, assim, há pouca possibilidade, até que se saiba, de que estas moléculas estimulem resposta imunológica não intencional a alguma molécula não relacionada. Em conclusão, os novos peptídeos epitópicos de HLA-A*024 ou HLA-A02 derivados de TOPK identificados aqui podem encontrar utilidade no campo de imunoterapia de câncer.

Aplicabilidade Industrial

[00457] A presente invenção fornece novos TAAs, particularmente aqueles derivados de TOPK, que podem induzir à respostas imunes antitumor potentes e específicas e, assim, têm aplicabilidade a uma ampla variedade de tipos de câncer. Tais TAAs podem encontrar uso como vacinas peptídicas contra doenças associadas à TOPK, por exemplo, câncer, mais particularmente leucemia mieloide aguda (AML), câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, câncer colo-retal, câncer gástrico difuso, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), linfoma, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma renal, câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) e tumor de tecidos moles .

[00458] Embora a presente invenção tenha sido descrita aqui em detalhes e com referência às modalidades específicas da mesma, deverá ser entendido que a descrição precedente é de natureza exemplificativa e explicativa e se destina a ilustrar a presente invenção e suas modalidades preferidas. Através de experimentação de rotina, aqueles versados na técnica reconhecerão facilmente que várias mudanças e modificações podem ser feitas na mesma sem fugir do espírito e âmbito da presente invenção, as metas e limites da qual são definidos pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para a indução de um CTL, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 28, 2, 3, 6 e 27 em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

2. Uso de um peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 28, 2, 3, 6 e 27,

em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável,

o referido uso caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para tratamento de câncer, ou indução de uma resposta imune contra o câncer.

3. Uso de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a referida composição farmacêutica é formulada para administração a um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A24.

4. Método *in vitro* para indução de uma APC com capacidade de indução de CTL, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

contatar uma APC com um peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 28, 2, 3, 6 e 27 *in vitro*.

5. Método *in vitro* para indução de um CTL, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de:

cocultivar uma célula T CD8 positiva com uma APC que apresenta, sobre sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 28, 2, 3, 6 e 27.