



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

(21) BR 112019018313-2 A2



(22) Data do Depósito: 02/03/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 19/05/2020

(54) Título: VACINAS PEPTÍDICAS

(51) Int. Cl.: G01N 33/569; A61K 38/00.

(30) Prioridade Unionista: 03/03/2017 EP 17159243.9; 03/03/2017 EP 17159242.1; 09/03/2017 GB 1703809.2.

(71) Depositante(es): TREOS BIO ZRT.

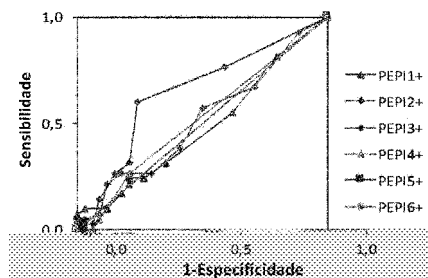
(72) Inventor(es): JULIANNA LISZIEWICZ; LEVENTE MOLNÁR; ENIKO TÖKE; JÓZSEF TOTH; ORSOLYA LORINCZ; ZSOLT CSISZOVSKY; ESZTER SOMOGYI; KATALIN PÁNTYA; MÓNKA MEGYESI.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018055230 de 02/03/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/158455 de 07/09/2018

(85) Data da Fase Nacional: 03/09/2019

(57) Resumo: A divulgação refere-se a polipeptídeos e composições farmacêuticas compreendendo polipeptídeos que encontram uso na prevenção ou tratamento de câncer, em particular câncer de mama, câncer de ovário e câncer colorretal. A divulgação também se refere a métodos para induzir uma resposta de células T citotóxicas em um indivíduo ou tratar de câncer administrando-se composições farmacêuticas compreendendo os peptídeos, e métodos de diagnóstico complementares para identificar indivíduos para tratamento. Os peptídeos compreendem epítopos de células T que são imunogênicos em uma alta porcentagem de pacientes.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"VACINAS PEPTÍDICAS"**

Campo

[001]A divulgação refere-se a polipeptídeos e vacinas que encontram uso na prevenção ou tratamento de câncer, em particular a maioria dos cânceres de mama, cânceres de ovário e cânceres colorretais.

Antecedentes

[002]O câncer mata milhões de pessoas em todo o mundo, pois os medicamentos existentes não permitem uma prevenção ou tratamento efetivos. As imunoterapias atuais de inibidores de ponto de verificação que reativam as respostas imunológicas existentes podem proporcionar benefícios clínicos para uma fração dos pacientes com câncer. As atuais vacinas contra câncer que induzem novas respostas imunes são pouco imunogênicas e não beneficiam a maioria dos pacientes.

[003]Análises recentes de 63.220 tumores únicos revelaram que as vacinas contra câncer precisam ser geradas especificamente para cada paciente, devido à extensa heterogeneidade genômica tumoral interindivíduos (Hartmaier et al. Genome Medicine 2017 9:16). Usando-se tecnologias de última geração, atualmente não é viável dimensionar vacinas contra câncer específicas para HLA para grandes populações.

## Sumário

[004] Nas células apresentadoras de antígenos APC (do inglês "antigen-presenting cells"), os antígenos proteicos são processados na forma de peptídeos. Estes peptídeos ligam-se às moléculas de antígeno leucocitário humano HLAs (do inglês "human leukocyte antigen") e são apresentados na superfície celular como complexos peptídeo-HLA às células T. Diferentes indivíduos expressam diferentes moléculas de HLA e diferentes moléculas de HLA apresentam peptídeos diferentes. Portanto, de acordo com o estado da técnica, um peptídeo, ou um fragmento de um polipeptídeo maior, é identificado como sendo imunogênico para um indivíduo humano específico se for apresentado por uma molécula de HLA que é expressa pelo indivíduo. Em outras palavras, o estado da técnica descreve peptídeos imunogênicos como sendo epítomos restritos a HLA. No entanto, os epítomos restritos a HLA induzem respostas de células T em apenas uma fração dos indivíduos que expressam a molécula de HLA. Peptídeos que ativam uma resposta de células T em um indivíduo são inativos em outros, apesar da correspondência de alelos de HLA. Portanto, não se sabia como as moléculas de HLA de um indivíduo apresentavam os epítomos derivados de antígenos que ativam positivamente respostas de células T.

[005] Conforme aqui proporcionado, múltiplos HLA expressos

por um indivíduo precisam apresentar o mesmo peptídeo para desencadear uma resposta de células T. Os fragmentos de um antígeno polipeptídico que são imunogênicos para um indivíduo específico são aqueles que podem se ligar a múltiplos HLAs de classe I (ativam células T citotóxicas) ou da classe II (ativam células T auxiliares) expressos por esse indivíduo. Por exemplo, os inventores descobriram que a presença de um epítipo de células T que se liga a pelo menos três HLA do tipo I de um indivíduo prediz uma resposta imune no indivíduo a um polipeptídeo.

[006] Com base nesta descoberta, os inventores identificaram os epítopos de células T a partir de antígenos polipeptídicos associados a certos cânceres de mama, ovário e/ou colorretal (antígenos de câncer/testículo (CTA)) que têm a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I em uma grande proporção de indivíduos. Esses epítopos de células T, ou fragmentos dos antígenos que compreendem os epítopos de células T, são úteis para induzir respostas imunes específicas contra células tumorais que expressam estes antígenos e para tratar ou prevenir o câncer.

[007] Em um primeiro aspecto, a divulgação proporciona um polipeptídeo que compreende um fragmento de até 50 aminoácidos consecutivos de



(a) um antígeno associado a câncer colorretal selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, LEMD1, MAGE-A8, MAGE-A6 e MAGE-A3, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250;

(b) um antígeno associado a câncer de ovário, selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA, e AKAP-3, em que o fragmento compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272 a 301; e/ou

(c) um antígeno associado a câncer de mama selecionado dentre PIWIL-2, AKAP-4, EpCAM, BORIS, HIWI, SPAG9, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, PRAME, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, HOM-TES-85 e NY-ESO-1, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194.

[008] Em alguns casos específicos, a divulgação proporciona um polipeptídeo que

(a) é um fragmento de um antígeno associado a câncer colorretal selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3 e LEMD1, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada

a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250;  
ou

(b) compreende ou consiste em dois ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer colorretal selecionados dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3 e LEMD1, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250, em que, opcionalmente, os fragmentos se sobrepõem ou estão dispostos de extremidade a extremidade no polipeptídeo; ou

(c) é um fragmento de um antígeno associado a câncer de ovário selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA e AKAP-3, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272 a 301; ou

(d) compreende ou consiste em dois ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer de ovário selecionados dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA e AKAP-3, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs:

272 a 301, em que, opcionalmente, os fragmentos se sobrepõem ou estão dispostos de extremidade a extremidade no polipeptídeo; ou

(e) é um fragmento de um antígeno associado a câncer de mama selecionado dentre SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-85, PIWIL-2, EpCAM, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, em que o fragmento compreende a sequência de aminoácidos a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194; ou

(f) compreende ou consiste em dois ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer de mama selecionados dentre SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-8, PIWIL-2, EpCAM, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194; em que, opcionalmente, os fragmentos se sobrepõem ou estão dispostos de extremidade a extremidade no polipeptídeo.

[009] Em alguns casos específicos, o polipeptídeo compreende ou consiste em fragmentos de

(a) TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3 e LEMD1;

(b) PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17,

PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA e AKAP-3; e/ou

(c) SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-8, PIWIL-2, EpCAM, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2;

[0010] Em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; SEQ ID NOs: 272 a 301; e/ou SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194.

[0011] Em alguns casos, o polipeptídeo compreende ou consiste em uma ou mais sequências de aminoácidos selecionadas a partir de SEQ ID NOs: 41-80, 251 a 271, 302 a 331 e 196 a 233.

[0012] Em alguns casos, o polipeptídeo compreende ou consiste em uma ou mais sequências de aminoácidos selecionadas a partir de SEQ ID NOs: 41-80, 195-233, 251-271 e 302-331 ou selecionados das SEQ ID NOs: 81-142, 332-346, e 435-449.

[0013] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona um painel de dois ou mais polipeptídeos, como descrito acima, em que cada peptídeo compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos diferente selecionada das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; o selecionada a partir das SEQ ID NOs: 272 a 301; ou selecionada a partir das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194; ou selecionada a partir das SEQ ID NOs: 1

a 40, 234 a 250, 272 a 301 e 172 a 194. Em alguns casos, o painel de polipeptídeos compreende ou consiste em um ou mais peptídeos compreendendo ou consistindo nas sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 130, 121, 131, 124, 134, 126 e/ou SEQ ID NOs: 435-449.

[0014] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona uma composição ou kit farmacêutico tendo um ou mais polipeptídeos ou painéis de peptídeos, como descrito acima como ingredientes ativos, ou tendo um polipeptídeo compreendendo pelo menos duas sequências de aminoácidos selecionadas a partir das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; SEQ ID NOs: 272 a 301; e/ou SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194 como ingrediente ativo; ou selecionada a partir das SEQ ID NOs: 130, 121, 131, 124, 134, 126 e/ou 435-449 como ingrediente ativo.

[0015] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona um método para induzir respostas imunes (por exemplo, vacinação, fornecimento de imunoterapia ou indução de uma resposta de células T citotóxicas em um indivíduo), compreendendo o método administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica, kit ou painel de polipeptídeos como descrito acima. O método pode ser um método de tratamento de câncer, tal como câncer de mama, câncer de ovário ou câncer colorretal.

[0016] Em aspectos adicionais, a divulgação

proporciona

- a composição farmacêutica, kit ou painel de polipeptídeos descritos acima para uso em um método para induzir respostas imunes ou para uso em um método de tratamento de câncer, opcionalmente câncer de mama, câncer de ovário ou câncer colorretal; e

- uso de um peptídeo ou de um painel de peptídeos como descrito acima na fabricação de um medicamento para induzir respostas imunes ou para tratar câncer, opcionalmente câncer de mama, câncer de ovário ou câncer colorretal.

[0017] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona um método para identificar um indivíduo humano que provavelmente terá uma resposta de células T citotóxicas à administração de uma composição farmacêutica como descrito acima, compreendendo o método

- (i) determinar que o(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica compreendem uma sequência que é um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I do indivíduo; e

- (ii) identificar que o indivíduo provavelmente tenha uma resposta de células T citotóxicas à administração da composição farmacêutica.

[0018] Em um aspecto adicional, a divulgação

proporciona um método para identificar um indivíduo que provavelmente terá uma resposta clínica a um método de tratamento como descrito acima, compreendendo o método

(i) determinar que o(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) compreende(m) duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é

a. um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo; e

b. um fragmento de um antígeno associado a câncer expresso por células cancerígenas do indivíduo; e

(ii) identificar o indivíduo como tendo probabilidade de ter uma resposta clínica ao método de tratamento.

[0019] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona um método para determinar a probabilidade de que um indivíduo humano específico terá uma resposta clínica a um método de tratamento de acordo com a reivindicação 10, em que um ou mais dos seguintes fatores correspondem a uma maior probabilidade de uma resposta clínica:

(a) presença no(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) de um maior número de sequências de aminoácidos e/ou sequências de aminoácidos diferentes que são, cada uma, um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo

menos três HLA de classe I do indivíduo;

(b) um maior número de antígenos polipeptídicos-alvo, compreendendo pelo menos uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I do indivíduo;

em que, opcionalmente, os antígenos polipeptídicos-alvo são expressos no indivíduo, em que, opcionalmente, os antígenos polipeptídicos-alvo adicionalmente estão em uma ou mais amostras obtidas do indivíduo;

(c) uma maior probabilidade de que o indivíduo expresse antígenos polipeptídicos-alvo, opcionalmente um número limite dos antígenos polipeptídicos alvo e/ou opcionalmente antígenos polipeptídicos-alvo que se determinou que compreendam pelo menos uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I do indivíduo;

e/ou

(d) um maior número de antígenos polipeptídicos-alvo que se prediga que o indivíduo expresse, opcionalmente, um maior



número de antígenos polipeptídicos-alvo que o indivíduo expresse com uma probabilidade limite, e/ou opcionalmente os antígenos polipeptídicos-alvo que se determinou que compreendem pelo menos uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I do indivíduo.

[0020] Em alguns casos, os antígenos associados a câncer podem ser TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, LEMD1, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3, PIWIL-4, WT1, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, PRAME, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, RHOXF-2, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, MAGE-A11, HOM-TES-85, NY-ESO-1 e AKAP-3. Em alguns casos, os métodos acima compreendem a etapa de se determinar que um ou mais antígenos associados a câncer sejam expressos pelas células cancerígenas do indivíduo. O(s) antígeno(s) associado(s) a câncer pode(m) estar presente(s) em uma ou mais amostras obtidas do indivíduo.

[0021] Em alguns casos, a administração da composição farmacêutica ou dos polipeptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s) do kit pode então ser selecionada como um método de tratamento para o indivíduo. O indivíduo pode adicionalmente ser tratado pela administração da composição farmacêutica ou

dos polipeptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s).

[0022] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona um método de tratamento como descrito acima, em que se tenha identificado que o indivíduo provavelmente tenha uma resposta clínica ou esteja acima de uma probabilidade mínima limite para ter uma resposta clínica ao tratamento pelo método descrito acima.

[0023] Em um aspecto adicional, a divulgação proporciona um método para identificar um indivíduo humano que provavelmente não terá uma resposta clínica a um método de tratamento como descrito acima, compreendendo o método

(i) determinar que o(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica não compreendem duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I do indivíduo; e

(ii) identificar o indivíduo como tendo probabilidade de não ter uma resposta clínica ao método de tratamento.

[0024] Os métodos descritos acima podem compreender a etapa de se determinar o genótipo de HLA de classe I do indivíduo.

[0025] A divulgação será agora descrita em mais

detalhes, a título de exemplo e não como limitação, e por referência aos desenhos em anexo. Muitas modificações e variações equivalentes ficarão aparentes para os especialistas na técnica quando lhes for dada esta divulgação. Consequentemente, os exemplos de modalidades da divulgação estabelecidos são considerados ilustrativos e não limitantes. Várias mudanças nas modalidades descritas podem ser feitas sem se afastar do escopo da divulgação. Todos os documentos aqui citados, supra ou infra, são expressamente incorporados por referência na sua totalidade.

[0026] A presente divulgação inclui a combinação dos aspectos e características preferidos descritos, exceto quando tal combinação for claramente inadmissível ou quando se declarar que devam ser expressamente evitados. Como usadas neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" também incluem referentes plurais, a menos que o conteúdo dite claramente o contrário. Assim, por exemplo, referência a "um peptídeo" inclui dois ou mais de tais peptídeos.

[0027] Os títulos das seções são usados aqui apenas por conveniência e não devem ser interpretados como limitativos de forma alguma.

#### Descrição das Figuras

Fig. 1

[0028] Curva ROC de biomarcadores PEPI restritos a HLA.

Fig. 2

[0029] Curva ROC de Teste PEPI3+  $\geq 1$  para a determinação da acurácia diagnóstica.

Fig. 3

[0030] Distribuição de PEPI3+ de HLA de classe I em comparação com as respostas de células T CD8+ medidas por um ensaio de última geração entre os "pools" (pequenos conjuntos) de peptídeos usados nos ensaios de resposta de células T CD8+. A: PEPI3+s restritos a HLA de classe I. O Percentual Geral de Concordância (OPA do inglês "Overall Percent of Agreement") de 90% entre as respostas de células T e peptídeos PEPI3+ demonstra a utilidade dos peptídeos inventados na predição do conjunto de respostas de células T induzidas por vacina dos indivíduos. B: Epítopos restritos a HLA de classe I (PEPI1+). A OPA entre os epítopos preditos e as respostas das células T CD8+ foi de 28% (não estatisticamente significativa). No cinza mais escuro: Verdadeiro Positivo (VP), foram detectadas respostas tanto de peptídeos quanto de células T; Em cinza claro: Falso Negativo (FN), foram detectadas apenas respostas de células T; No cinza mais claro: Falso Positivo (FP), foram detectados apenas peptídeos; Em cinza escuro: Verdadeiro

Negativo (VN): não foram detectadas respostas nem de peptídeos nem de células T.

Fig. 4

[0031] Distribuição de PEPIs de HLA de classe II em comparação com as respostas de células T CD4+ medidas por um ensaio de última geração entre os "pools" de peptídeos usados nos ensaios. A: PEPI4+s restritos a HLA de classe II. OPA de 67% entre as respostas de PEPI4+ e de células T CD4+ ( $p=0,002$ ). B: Os epítomos restritos a HLA de classe II. A OPA entre os epítomos restritos a HLA de classe II e as respostas de células T CD4+ foi de 66% (não significante estatisticamente). No cinza mais escuro: Verdadeiro Positivo (VP), foram detectadas respostas tanto de peptídeos quanto de células T; Em cinza claro: Falso Negativo (FN), foram detectadas apenas respostas de células T; No cinza mais claro: Falso Positivo (FP), foram detectados apenas peptídeos; Em cinza escuro: Verdadeiro Negativo (VN): não foram detectadas respostas nem de peptídeos nem de células T.

Fig. 5

[0032] Múltiplos peptídeos de ligação a HLA que definem o conjunto de respostas de células T específicas para a vacina de HPV-16 LPV de 18 pacientes com NIV-3 e 5 com câncer cervical. Contagens de PEPI3 restritos a HLA de classe I (A e B) e

contagens de PEPI3 restritos a HLA de classe II (C e D) derivados a partir de antígenos LPV de cada paciente. Em cinza claro: respondedores imunes medidos após a vacinação no ensaio clínico; Em cinza escuro: Não respondedores imunes medidos após a vacinação no ensaio clínico. Os resultados mostram que peptídeos de ligação a HLA de classe I  $\geq 3$  predizem reatividade das células T CD8+ e que peptídeos de ligação a HLA classe II  $\geq 4$  predizem reatividade das células T CD4+.

Fig. 6

[0033] Os peptídeos que se ligam a múltiplos HLA de classe I que definem o conjunto de respostas de células T específicas para a vacina de HPV de 2 pacientes. A: Quatro antígenos de HPV na vacina de HPV. Os retângulos representam o comprimento das sequências de aminoácidos desde o N-terminal até o C-terminal. B: Processo para identificar os peptídeos que se ligam a múltiplos HLA de classe I de duas pacientes: sequências de HLA das pacientes marcadas como genótipo de HLA de 4 dígitos diretamente a partir da ID da paciente. A localização do 1º aminoácido dos epítomos 54 e 91 que podem se ligar a HLAs (PEPI1+) da paciente 12-11 e da paciente 14-5, respectivamente, são representadas com linhas. PEPI2 representa os peptídeos selecionados a partir de PEPI1+s que podem se ligar a múltiplos HLAs de um paciente (PEPI2+). PEPI3

representa peptídeos que podem se ligar a  $\geq 3$  HLAs de um paciente (PEPI3+). PEPI4 representa peptídeos que podem se ligar a  $\geq 4$  HLAs de um paciente (PEPI4+). PEPI5 representa peptídeos que podem se ligar a  $\geq 5$  HLAs de um paciente (PEPI5+). PEPI6 representa peptídeos que podem se ligar a 6 HLAs de um paciente (PEPI6). C: O conjunto de PEPI3+ específico da vacina de DNA de duas pacientes caracteriza suas respostas de células T específicas da vacina.

Fig. 7

[0034] Correlação entre o Escore de PEPI3+  $\geq 1$  e taxas de resposta de CTL de alvos peptídicos determinadas em ensaios clínicos.

Fig. 8

[0035] Correlação entre o Escore de PEPI3+  $\geq 1$  e a Taxa de Resposta Imune (TRI) clínica de vacinas de imunoterapia. Linhas tracejadas: faixa de confiança de 95%.

Fig. 9

[0036] Correlação entre o Escore de PEPI3+  $\geq 2$  e a Taxa de Controle da Doença (TCD) de vacinas de imunoterapia. Linhas tracejadas: faixa de confiança de 95%.

Fig. 10

[0037] Exemplo de análise "hotspot" de peptídeos:

"Hotspot" de antígeno PRAME em 433 pacientes da População Modelo. No eixo y, estão os 433 pacientes da População Modelo; no eixo x, está a sequência de aminoácidos do antígeno PRAME (CTA). Cada ponto de dado representa um PEPI apresentado por HLA de classe I  $\geq 3$  de um paciente, começando na posição de aminoácido especificada. Os dois PEPIs mais frequentes (denominados bestEPIs) do antígeno PRAME estão destacados em cinza escuro ("hotspots" de peptídeos= Hotspots de PEPI).

Fig. 11

[0038] Curva de expressão de CTA calculada analisando-se dados de frequência de expressão de antígenos específicos de tumores (CTAs) em tecidos de câncer de mama humanos. (Não foram incluídos quaisquer dados de linhagens celulares.)

Fig. 12

[0039] Distribuição da expressão de antígenos para câncer de mama com base no cálculo de respostas a multiantígenos a partir de frequências de expressão dos 10 CTAs diferentes selecionados. A: distribuição não cumulativa para calcular o valor esperado para o número de antígenos expressos (AG50). Este valor mostra que provavelmente 6,14 antígenos da vacina serão expressos por células de tumores de mama. B: curva de distribuição cumulativa do número mínimo de antígenos expressos (curva de expressão de CTA). Isto mostra que, no



mínimo, 4 antígenos da vacina serão expressos com 95% de probabilidade nas células de câncer de mama (AG95).

Fig. 13

[0040] PEPI representando antígenos: distribuição de antígenos de CTA específicos da vacina contra câncer de mama com  $PEPI \geq 1$ , denominada "AP") na População Modelo (n=433) para vacina contra câncer de mama. A: distribuição não cumulativa de AP onde o número médio de AP é:  $AP_{50}=5,30$ , o que significa que, em média, quase 6 CTAs terão PEPIs na População Modelo. B: curva de distribuição cumulativa do número mínimo de APs na População Modelo (n=433). Isto mostra que pelo menos um antígeno da vacina terá PEPIs em 95% da População Modelo (n=433) ( $AP_{95}=1$ ).

Fig. 14

[0041] PEPI representou a distribuição de antígenos expressos (antígenos CTA específicos da vacina contra câncer de mama expressos pelo tumor, para os quais se prediz  $PEPI \geq 1$ , denominada "AGP") na população modelo (n=433) calculada com as taxas de expressão de CTA para câncer de mama. A: distribuição não cumulativa de AGP onde o valor esperado para CTA expressos em números representados por PEPI é  $AGP_{50}=3,37$ .  $AGP_{50}$  é uma medida da efetividade da vacina contra câncer de mama divulgada em atacar o tumor de mama em uma população de pacientes não

selecionados.  $AGP50=3,37$  significa que pelo menos 3 CTAs da vacina provavelmente serão expressos pelas células do tumor de mama e apresentarão PEPis na População Modelo. B: a curva de distribuição cumulativa do número mínimo de AGPs na População Modelo ( $n=433$ ) mostra que pelo menos 1 dos CTAs da vacina apresentará PEPis em 92% da população e os 8% restantes da população provavelmente não terão nenhum AGP ( $AGP95=0$ ,  $AGP92=1$ ).

Fig. 15

[0042] Curva de expressão de CTA calculada analisando-se dados de frequência de expressão de antígenos específicos de tumores (CTAs) em tecidos de câncer colorretal humano. (Não foram incluídos quaisquer dados de linhagens celulares.)

Fig. 16

[0043] Distribuição da expressão de antígenos para câncer colorretal com base no cálculo de respostas a multiantígenos a partir de frequências de expressão dos 7 CTAs diferentes selecionados. A: distribuição não cumulativa para calcular o valor esperado para o número de antígenos da vacina expressos em cânceres colorretais ( $AG50$ ). Este valor mostra que provavelmente 4,96 antígenos da vacina serão expressos por células de tumores colorretais. B: curva de distribuição cumulativa do número mínimo de antígenos expressos (curva de

expressão de CTA). Isto mostra que no mínimo 3 antígenos serão expressos com 95% de probabilidade na célula de câncer colorretal (AG95).

Fig. 17

[0044] PEPI representou a distribuição de antígenos (antígenos CTA-específicos para a vacina contra câncer colorretal para os quais se prediz  $PEPI \geq 1$ . Denominada "AP") na população modelo (n=433) para câncer colorretal. A: distribuição não cumulativa de AP onde o número médio de AP é:  $AP_{50}=4,73$ , significando que, em média, 5 CTAs serão representados por PEPIs na população modelo B: curva de distribuição cumulativa do número mínimo de APs na população modelo (n=433). Isto mostra que 2 ou mais antígenos serão representados por PEPIs em 95% da população modelo (n=433) ( $AP_{95}=2$ ).

Fig. 18

[0045] PEPI representou a distribuição de antígenos expressos (antígenos CTA-específicos para a vacina contra câncer colorretal expressos pelo tumor, para os quais se prediz  $PEPI \geq 1$ . Denominada "AGP") na população modelo (n=433) calculada com taxas de expressão de CTA para câncer colorretal. A: distribuição não cumulativa de AGP onde o valor esperado para CTAs expressos em números representados por PEPI é

AGP50=2,54. AGP50 é uma medida da efetividade da vacina divulgada contra câncer colorretal em atacar tumores colorretais em uma população de pacientes não selecionados. AGP50=2,54 significa que pelo menos 2-3 CTAs da vacina provavelmente serão expressos pelas células de tumores colorretais e apresentarão PEPIs na População Modelo. B: a curva de distribuição cumulativa do número mínimo de AGPs na População Modelo (n=433) mostra que pelo menos 1 dos CTAs da vacina será expresso e também apresentará PEPIs em 93% da população (AGP93=1).

Fig. 19

[0046] Esquema mostrando exemplos de posições de aminoácidos em epítomos que se ligam a HLA de classe I e a HLA de classe II em um peptídeo 30-mérico.

Fig. 20

[0047] Antigenicidade da vacina PoliPEPI1018 CRC em uma população geral. A antigenicidade de PoliPEPI1018 em um indivíduo é determinada pela contagem de AP, que indica o número de antígenos da vacina que induzem respostas de células T em um indivíduo. A contagem de AP de PoliPEPI1018 foi determinada em cada um dos 433 indivíduos na População Modelo usando-se o Teste PEPI, e a contagem de AP50 foi, então, calculada para a População Modelo. O AP50 de PoliPEPI1018 na

População Modelo é de 4,73. O número médio de antígenos imunogênicos (isto é, antígenos com PEPI  $\geq 1$ ) em PoliPEPI1018 em uma população geral é de 4,73. Abreviações: AP = antígenos com PEPI  $\geq 1$ . Painel da Esquerda: Curva de distribuição cumulativa. Painel da Direita: Curva de distribuição distinta.

Fig. 21

[0048] Efetividade da vacina PoliPEPI1018 CRC em uma população geral. As células T induzidas por vacina podem reconhecer e matar células tumorais se um PEPI na vacina for apresentado pela célula tumoral. O número de AGPs (antígenos expressos com PEPI) é um indicador da efetividade da vacina em um indivíduo e depende tanto da potência e quanto da antigenicidade de PoliPEPI1018. O número médio de CTAs imunogênicos (isto é, AP [antígenos expressos com PEPI  $\geq 1$ ]) em PoliPEPI1018 é de 2,54 na População Modelo. A probabilidade de PoliPEPI1018 induzir respostas de células T contra múltiplos antígenos em um indivíduo (isto é, mAGP) na População Modelo é de 77%.

Fig. 22

[0049] Probabilidade de expressão de antígenos da vacina nas células tumorais da paciente XYZ. Há uma probabilidade maior que 95% de que 5 dos 12 antígenos-alvo no regime de vacina sejam expressos no tumor da paciente.

Consequentemente, as 12 vacinas de peptídeos, em conjunto, podem induzir respostas imunes contra pelo menos 5 antígenos de câncer de ovário com 95% de probabilidade (AGP95). Há 84% de probabilidade de que cada peptídeo induzirá respostas imunes na paciente XYZ. AGP50 é a média (valor esperado)= 7,9 (é uma medida da efetividade da vacina em atacar o tumor da paciente XYZ).

Fig. 23

[0050] Achados de imageamento por ressonância magnética da paciente XYZ tratada com vacina personalizada (PIT). Nesta fase tardia, a paciente com câncer de ovário consideravelmente pré-tratada teve uma resposta objetiva inesperada após o tratamento com a vacina PIT. Estes achados de imageamento por ressonância magnética sugerem que a vacina PIT em combinação com quimioterapia reduziu significativamente sua carga tumoral. A paciente agora continua com o tratamento de vacina PIT.

Fig. 24

[0051] Probabilidade de expressão de antígenos da vacina nas células tumorais da paciente ABC. Há uma probabilidade maior que 95% de que 4 dos 13 antígenos-alvo na vacina sejam expressos no tumor da paciente. Consequentemente, as 12 vacinas de peptídeos, em conjunto, podem induzir

respostas imunes contra, pelo menos, 4 antígenos de câncer de mama com 95% de probabilidade (AGP95). Há 84% de probabilidade de que cada peptídeo induzirá respostas imunes na paciente ABC. AGP50 é a média (valor esperado) da distribuição de probabilidade discreta = 6,45 (é uma medida da efetividade da vacina em atacar o tumor da paciente ABC).

#### Descrição das Sequências

[0052] As SEQ ID NOs: 1 a 20 apresentam epítomos de células T 9-méricos descritos na Tabela 17.

[0053] As SEQ ID NOs: 21 a 40 apresentam epítomos de células T 9-méricos descritos na Tabela 20.

[0054] As SEQ ID NOs: 41 a 60 apresentam epítomos de células T 15-méricos descritos na Tabela 17.

[0055] As SEQ ID NOs: 61 a 80 apresentam epítomos de células T 15-méricos descritos na Tabela 20.

[0056] As SEQ ID NOs: 81 a 111 apresentam peptídeos de vacina contra câncer de mama descritos na Tabela 18a.

[0057] As SEQ ID NOs 112 a 142 eapresentam peptídeos de vacina contra câncer colorretal descritos na tabela 21a.

[0058] As SEQ ID NOs 143 a 158 apresentam antígenos associados a câncer de mama, câncer colorretal e/ou câncer de ovário.

[0059] As SEQ ID NOs 159 a 171 apresentam as sequências

peptídicas adicionais descritas na Tabela 10.

[0060] As SEQ ID NOs 172 a 194 apresentam epítomos adicionais de células T 9-méricos descritos na Tabela 17.

[0061] As SEQ ID NOs 195 a 233 apresentam epítomos adicionais de células T 15-méricos descritos na Tabela 17.

[0062] As SEQ ID NOs 234 a 250 apresentam epítomos adicionais de células T 9-méricos descritos na Tabela 20.

[0063] As SEQ ID NOs 251 a 271 apresentam epítomos adicionais de células T 15-méricos descritos na Tabela 20.

[0064] As SEQ ID NOs: 272 a 301 apresentam epítomos de células T 9-méricos descritos na Tabela 23.

[0065] As SEQ ID NOs: 302 a 331 apresentam epítomos de células T 15-méricos descritos na Tabela 23.

[0066] As SEQ ID NOs: 332 a 346 apresentam peptídeos da vacina contra câncer de ovário apresentados na Tabela 24.

[0067] As SEQ ID NOs: 347 a 361 apresentam antígenos adicionais associados a câncer de mama, câncer colorretal e/ou a câncer de ovário.

[0068] As SEQ ID NOs: 362 a 374 apresentam peptídeos de vacina personalizados desenhados para a paciente XYZ descritos na Tabela 38.

[0069] As SEQ ID NOs: 375 a 386 apresentam peptídeos de vacina personalizados desenhados para a paciente ABC



descritos na Tabela 41.

[0070] As SEQ ID NOs 387 a 434 apresentam epítomos adicionais de células T 9-méricos descritos na tabela 32.

[0071] As SEQ ID NOs: 435 a 449 apresentam peptídeos adicionais de vacina contra câncer de mama descritos na Tabela 18a.

#### Descrição Detalhada

##### Genótipos de HLA

[0072] Os HLAs são codificados pelos genes mais polimórficos do genoma humano. Cada pessoa tem um alelo materno e um paterno para as três moléculas de HLA de classe I (HLA-A\*, HLA-B\*, HLA-C\*) e quatro moléculas de HLA de classe II (HLA-DP\*, HLA-DQ\*, HLA-DRB1\*, HLA-DRB3\*/4\*/5\*). Praticamente, cada pessoa expressa uma combinação diferente de 6 moléculas de HLA de classe I e 8 moléculas de HLA de classe II que apresentam epítomos diferentes do mesmo antígeno proteico. A função das moléculas de HLA é regular as respostas de células T. No entanto, até o momento, não se sabia como os HLAs de uma pessoa regulavam a ativação das células T.

[0073] A nomenclatura usada para designar a sequência de aminoácidos da molécula de HLA é a seguinte: nome do gene\*alelo:número da proteína, podendo, por exemplo, parecer-se com: HLA-A\*02:25. Neste exemplo, "02" refere-se ao alelo.

Na maioria dos casos, os alelos são definidos por sorotipos - o que significa que as proteínas de um determinado alelo não reagirão entre si em ensaios sorológicos. Os números de proteínas ("25" no exemplo acima) são atribuídos consecutivamente à medida que a proteína é descoberta. Um novo número de proteína é atribuído a qualquer proteína com uma sequência de aminoácidos diferente (por exemplo, mesmo uma mudança de um aminoácido na sequência é considerada um número de proteína diferente). Informações adicionais sobre a sequência de ácidos nucleicos de um determinado *locus* podem ser anexadas à nomenclatura de HLAs, mas tais informações não são necessárias para os métodos aqui descritos.

[0074] O genótipo de HLA de classe I ou o genótipo de HLA de classe II de um indivíduo pode referir-se à sequência de aminoácidos real de cada HLA de classe I ou da classe II de um indivíduo, ou pode referir-se à nomenclatura que, como descrito acima, designa minimamente o alelo e o número de proteína de cada gene de HLA. Um genótipo de HLA pode ser determinado usando-se qualquer método adequado. Por exemplo, a sequência pode ser determinada através de sequenciamento dos *loci* de genes de HLA usando-se métodos e protocolos conhecidos na técnica. Alternativamente, o conjunto de HLA de um indivíduo pode ser armazenado em uma base de dados e acessado usando-se

métodos conhecidos na técnica.

[0075] Alguns indivíduos podem ter dois alelos de HLA que codificam a mesma molécula de HLA (por exemplo, duas cópias para HLA-A\*02:25 em caso de homozigose). As moléculas de HLA codificadas por estes alelos ligam-se todas aos mesmos epítomos de células T. Para os propósitos desta divulgação "que se liga(m) a pelo menos duas moléculas de HLA do indivíduo", como aqui usado, inclui a ligação às moléculas de HLA codificadas por dois alelos de HLA idênticos em um único indivíduo. Em outras palavras, "que se ligam a pelo menos duas moléculas de HLA do indivíduo" e semelhantes poderiam, de outra forma, ser expressos como "que se ligam a moléculas de HLA codificadas por pelo menos dois alelos de HLA do indivíduo".

#### Polipeptídeos

[0076] A divulgação refere-se a polipeptídeos que são derivados de CTAs e que são imunogênicos para uma grande proporção da população humana.

[0077] Como aqui usado, o termo "polipeptídeo" refere-se a uma proteína de comprimento total, uma porção de uma proteína, ou um peptídeo caracterizado como sendo um "cordão" ("string") de aminoácidos. Como aqui usado, o termo "peptídeo" refere-se a um polipeptídeo curto compreendendo entre 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 7, ou 8, ou 9, ou 10, ou 11, ou 12, ou

13, ou 14, ou 15 e 10, ou 11, ou 12, ou 13, ou 14, ou 15, ou 20, ou 25, ou 30, ou 35, ou 40, ou 45, ou 50 ou 55 ou 60 aminoácidos.

[0078] Os termos "fragmento" ou "fragmento de um polipeptídeo", conforme aqui usados, referem-se a um "cordão" de aminoácidos ou a uma sequência de aminoácidos tipicamente com um comprimento reduzido em relação ao ou a um polipeptídeo de referência e compreendendo, ao longo da porção comum, uma sequência de aminoácidos idêntica à do polipeptídeo de referência. Tal fragmento de acordo com a divulgação pode ser, quando apropriado, incluído em um polipeptídeo maior do qual é um constituinte. Em alguns casos, o fragmento pode compreender todo o comprimento do polipeptídeo, por exemplo, quando todo o polipeptídeo, tal como um peptídeo de 9 aminoácidos, for um único epítipo de células T. Em alguns casos, os fragmentos aos quais aqui se refere podem ter entre 2, ou 3, ou 4, ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 e 20, ou 25, ou 30, ou 35, ou 40, ou 45, ou 50 aminoácidos.

[0079] Como aqui usado, o termo "epítipo" ou "epítipo de células T" refere-se a uma sequência de aminoácidos contíguos contidos em um antígeno proteico que possui uma afinidade de ligação por (tem a capacidade de se ligar a) um ou mais HLAs. Um epítipo é específico para HLA e para antígeno

(pares HLA-epítipo, preditos com métodos conhecidos), mas não é específico para um indivíduo. Um epítipo, um epítipo de células T, um polipeptídeo, um fragmento de um polipeptídeo ou uma composição compreendendo um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo é "imunogênico" para um indivíduo humano específico se tiver a capacidade de induzir uma resposta de células T (uma resposta de células T citotóxicas ou uma resposta de células T auxiliares) nesse indivíduo. Em alguns casos, a resposta de células T auxiliares é uma resposta de células T auxiliares do tipo Th1. Em alguns casos, um epítipo, um epítipo de células T, um polipeptídeo, um fragmento de um polipeptídeo ou uma composição compreendendo um polipeptídeo ou um fragmento do mesmo é "imunogênico" para um indivíduo humano específico se for mais provável que induza uma resposta de células T ou uma resposta imune no indivíduo do que um epítipo diferente de células T (ou, em alguns casos, dois epítopos diferentes de células T cada) que tenha a capacidade de se ligar a apenas uma molécula de HLA do indivíduo.

[0080] Os termos "resposta de células T" e "resposta imune" são aqui usados de forma intercambiável e referem-se à ativação de células T e/ou à indução de uma ou mais funções efectoras após o reconhecimento de um ou mais pares de ligação HLA-epítipo. Em alguns casos, uma "resposta imune" inclui uma

resposta de anticorpos, pois as moléculas de HLA de classe II estimulam respostas auxiliares que estão envolvidas na indução tanto de respostas de CTL de longa duração quanto de respostas de anticorpos. As funções efetoras incluem citotoxicidade, produção de citocinas e proliferação. De acordo com a presente divulgação, um epítopo, um epítopo de células T, ou um fragmento de um polipeptídeo é imunogênico para um indivíduo específico se tiver a capacidade de se ligar a pelo menos dois ou, em alguns casos, a pelo menos três, HLAs de classe I ou a pelo menos dois ou, em alguns casos, a pelo menos três ou a pelo menos quatro HLAs de classe II do indivíduo.

[0081] Para os propósitos desta divulgação, cunhamos o termo "epítopo pessoal", ou "PEPI", para distinguir epítopos específicos de indivíduos dos epítopos específicos para HLA. Um "PEPI" é um fragmento de um polipeptídeo consistindo em uma sequência de aminoácidos contíguos do polipeptídeo que é um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a uma ou mais moléculas de HLA de classe I de um indivíduo humano específico. Em outros casos, um "PEPI" é um fragmento de um polipeptídeo consistindo em uma sequência de aminoácidos contíguos do polipeptídeo que é um epítopo de células T que tem capacidade de se ligar a uma ou mais moléculas de HLA de classe II de um indivíduo humano específico. Em outras

palavras, um "PEPI" é um epítopo de células T que é reconhecido pelo conjunto de HLA de um indivíduo específico e, consequentemente, é específico para o indivíduo em adição ao HLA e ao antígeno. Em contraste com um "epítopo", que é específico apenas para o HLA e para o antígeno, PEPIs são específicos para um indivíduo, pois indivíduos diferentes têm moléculas de HLA diferentes, cada uma das quais ligando-se a diferentes epítopos de células T. Esta especificidade dos PEPIs para indivíduos permite fazer vacinas personalizadas contra câncer.

[0082] "PEPI1", como aqui usado, refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a uma molécula de HLA de classe I (ou, em contextos específicos, a uma molécula de HLA de classe II) de um indivíduo. "PEPI1+" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a uma ou mais moléculas de HLA de classe I de um indivíduo.

[0083] "PEPI2" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a duas moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo. "PEPI2+" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a duas ou mais moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo, isto é, a um fragmento identificado

de acordo com um método da divulgação.

[0084] "PEPI3" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a três moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo. "PEPI3+" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a três ou mais moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo.

[0085] "PEPI4" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a quatro moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo. "PEPI4+" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a quatro ou mais moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo.

[0086] "PEPI5" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a cinco moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo. "PEPI5+" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a cinco ou mais moléculas de HLA de classe I (ou II) de um indivíduo.

[0087] "PEPI6" refere-se a um peptídeo, ou a um fragmento de um polipeptídeo, que pode se ligar a todas as seis moléculas de HLA de classe I (ou seis de HLA de classe II) de um indivíduo.



[0088] De um modo geral, os epítomos apresentados pelas moléculas de HLA de classe I têm um comprimento de cerca de nove aminoácidos e os epítomos apresentados pelas moléculas de HLA de classe II têm cerca de quinze aminoácidos de comprimento. Para os propósitos desta divulgação, no entanto, um epítomo pode ter mais ou menos do que nove (para HLA de classe I) ou mais ou menos do que quinze (para HLA de classe II) aminoácidos de comprimento, contanto que o epítomo tenha a capacidade de se ligar a HLA. Por exemplo, um epítomo que tem a capacidade de se ligar a HLA de classe I pode ter entre 7, ou 8 ou 9 e 9 ou 10 ou 11 aminoácidos de comprimento. Um epítomo que tem a capacidade de se ligar a um HLA de classe II pode ter entre 13, ou 14 ou 15 e 15 ou 16 ou 17 aminoácidos de comprimento.

[0089] Um dado HLA de um indivíduo apenas apresentará às células T um número limitado de peptídeos diferentes produzidos pelo processamento de antígenos proteicos em uma APC. Como aqui usados, "exibir" ou "apresentar", quando usados em relação a HLA, fazem referência à ligação entre um peptídeo (epítomo) e um HLA. Nesse sentido, "exibir" ou "apresentar" um peptídeo são sinônimos de "ligar(-se)" (a) um peptídeo.

[0090] Usando-se técnicas conhecidas na técnica, é possível determinar os epítomos que se ligarão a um HLA

conhecido. Qualquer método adequado pode ser usado, contanto que o mesmo método seja usado para determinar múltiplos pares de ligação HLA-epítopo que são comparados diretamente. Por exemplo, podem ser usadas análises bioquímicas. Também é possível usar listas de epítopos que se sabe que sejam ligados por um determinado HLA. Também é possível usar *software* preditivo ou de modelagem para determinar quais epítopos podem ser ligados por um determinado HLA. São fornecidos exemplos na Tabela 1. Em alguns casos, um epítopo de células T tem a capacidade de se ligar a um dado HLA se tiver uma CI50 ou uma CI50 predita menor do que 5000 nM, menor do que 2000 nM, menor do que 1000 nM, ou menor do que 500 nM.

Tabela 1 - Exemplo de *softwares* para determinar a ligação epítopo-HLA

FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS	ENDEREÇO NA WEB
BIMAS, NIH	www- bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/
PPAPROC, Tubingen Univ.	
MHCPred, Edward Jenner Inst. of Vaccine Res.	

EpiJen, Edward Jenner Inst. of Vaccine Res.	<a href="http://www.ddg-pharmfac.net/epijen/EpiJen/EpiJen.htm">http://www.ddg-pharmfac.net/epijen/EpiJen/EpiJen.htm</a>
NetMHC, Center for Biological Sequence Analysis	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/</a>
SVMHC, Tübingen Univ.	<a href="http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SVMHC/">http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SVMHC/</a>
SYFPEITHI, Biomedical Informatics, Heidelberg	<a href="http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm">http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm</a>
ETK EPITOOLKIT, Tübingen Univ.	<a href="http://etk.informatik.uni-tuebingen.de/epipred/">http://etk.informatik.uni-tuebingen.de/epipred/</a>
PREDEP, Hebrew Univ. Jerusalem	<a href="http://margalit.huji.ac.il/Teppred/mhc-bind/index.html">http://margalit.huji.ac.il/Teppred/mhc-bind/index.html</a>
RANKPEP, MIF Bioinformatics	<a href="http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/">http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/</a>
IEDB, Immune Epitope Database	<a href="http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html">http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html</a>
EPITOPE DATABASES	ENDEREÇO NA WEB
MHCBN, Institute of Microbial Technology,	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/mhc">http://www.imtech.res.in/raghava/mhc</a> bn/

Chandigarh, INDIA	
SYFPEITHI, Biomedical Informatics, Heidelberg	<a href="http://www.syfpeithi.de/">http://www.syfpeithi.de/</a>
AntiJen, Edward Jenner Inst. of Vaccine Res.	<a href="http://www.ddg-pharmfac.net/antijen/AntiJen/antijenhomepage.htm">http://www.ddg-pharmfac.net/antijen/AntiJen/antijenhomepage.htm</a>
EPIMHC database of MHC ligands, MIF Bioinformatics	<a href="http://immunax.dfci.harvard.edu/epimhc/">http://immunax.dfci.harvard.edu/epimhc/</a>
IEDB, Immune Epitope Database	<a href="http://www.iedb.org/">http://www.iedb.org/</a>

[0091] Em algumas modalidades, os peptídeos da divulgação podem compreender ou consistir em um ou mais fragmentos de um ou mais CTAs. Os CTAs não são tipicamente expressos após o desenvolvimento embrionário em células saudáveis. Em adultos saudáveis, a expressão de CTA está limitada a células germinativas masculinas que não expressam HLA's e não podem apresentar antígenos a células T. Portanto, os CTAs são considerados neoantígenos de expressão quando expressos em células cancerígenas.

[0092] Os CTAs são uma boa escolha para alvos de vacinas contra câncer porque sua expressão é (i) específica

para células tumorais, (ii) mais frequente em metástases do que em tumores primários e (iii) conservada entre metástases do mesmo paciente (Gajewski ed. Targeted Therapeutics in Melanoma. Springer New York. 2012).

[0093] Os peptídeos da divulgação podem compreender ou consistir em um ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer de mama selecionados a partir de SPAG9 (SEQ ID NO: 143), AKAP-4 (SEQ ID NO: 144), BORIS (SEQ ID NO: 145), NY-SAR-35 (SEQ ID NO: 146), NY-BR-1 (SEQ ID NO: 147), SURVIVINA (SEQ ID NO: 148), MAGE-A11 (SEQ ID NO: 149), PRAME (SEQ ID NO: 150), MAGE-A9 (SEQ ID NO: 151), HOM-TES-85 (SEQ ID NO: 152), PIWIL-2 (SEQ ID NO: 349), EpCAM (SEQ ID NO: 154), HIWI (SEQ ID NO: 350), PLU-1 (SEQ ID NO: 351), TSGA10 (SEQ ID NO: 351), ODF-4 (SEQ ID NO: 352), SP17 (SEQ ID NO: 354), RHOXF-2 (SEQ ID NO: 355), e NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 356); um ou mais antígenos associados a câncer de ovário selecionados dentre PIWIL-4 (SEQ ID NO: 357), WT1 (SEQ ID NO: 358), EpCAM (SEQ ID NO: 154), BORIS (SEQ ID NO: 145), AKAP-4 (SEQ ID NO: 144), OY-TES-1 (SEQ ID NO: 359), SP17 (SEQ ID NO: 354), PIWIL-2 (SEQ ID NO: 349), PIWIL-3 (SEQ ID NO: 360), SPAG9 (SEQ ID NO: 143), PRAME (SEQ ID NO: 150), HIWI (SEQ ID NO: 350), SURVIVINA (SEQ ID NO: 148), e AKAP-3 (SEQ ID NO: 361); e/ou um ou mais antígenos associados a câncer colorretal selecionados dentre TSP50 (SEQ ID NO: 153),

EpCAM (SEQ ID NO: 154), SPAG9 (SEQ ID NO: 143), CAGE1 (SEQ ID NO: 155), FBXO39 (SEQ ID NO: 156), SURVIVINA (SEQ ID NO: 148), MAGE-A8 (SEQ ID NO 157), MAGE-A6 (SEQ ID NO: 158), LEMD1 (SEQ ID NO:348) e MAGE-A3 (SEQ ID NO: 347). Em alguns casos, o peptídeo compreende ou consiste em uma ou mais sequências de aminoácidos selecionadas a partir de SEQ ID NOs: 41-80, ou a partir das SEQ ID NOs: 41-80, 195-233, 251-271 e 302-331 que são otimizadas para ativação de células T/ligação a todos os tipos de HLA em toda a população.

[0094] Em alguns casos, a sequência de aminoácidos é flanqueada no N- e/ou no C-terminal por aminoácidos adicionais que não fazem parte da sequência do antígeno polipeptídico-alvo, em outras palavras, que não são a mesma sequência de aminoácidos consecutivos encontrados adjacentes aos fragmentos selecionados no antígeno polipeptídico-alvo. Em alguns casos, a sequência é flanqueada por até 41 ou 35 ou 30 ou 25 ou 20 ou 15 ou 10, ou 9 ou 8 ou 7 ou 6 ou 5 ou 4 ou 3 ou 2 ou 1 aminoácido adicional no N- e/ou no C-terminal ou entre fragmentos polipeptídicos-alvo. Em outros casos, cada polipeptídeo ou consiste em um fragmento de um antígeno polipeptídico-alvo, ou consiste em dois ou mais de tais fragmentos dispostos de extremidade a extremidade (dispostos sequencialmente no peptídeo de extremidade a extremidade) ou sobrepondo-se em um

único peptídeo (onde dois ou mais dos fragmentos compreendem sequências parcialmente sobrepostas, por exemplo, onde dois EPIs no mesmo polipeptídeo estão a 50 aminoácidos um do outro).

[0095] Quando fragmentos de diferentes polipeptídeos ou de diferentes regiões do mesmo polipeptídeo são unidos em um peptídeo engenheirado, existe o potencial de serem gerados neoepítomos em torno da união ou junção. Tais neoepítomos abrangem pelo menos um aminoácido de cada fragmento de cada lado da união ou junção e, aqui, pode-se referir a eles como sequências de aminoácidos juncionais. Os neoepítomos podem induzir respostas indesejadas de células T contra células saudáveis (autoimunidade). Os peptídeos podem ser desenhados, ou os peptídeos podem ser triados, para evitar, eliminar ou minimizar neoepítomos que correspondam a um fragmento de uma proteína expressa em células humanas saudáveis normais e/ou a neoepítomos que têm a capacidade de se ligar a pelo menos duas, ou, em alguns casos, a pelo menos três, ou a pelo menos quatro moléculas de HLA de classe I do indivíduo, ou, em alguns casos, a pelo menos duas, ou a pelo menos três ou quatro ou cinco moléculas de HLA de classe II do indivíduo. Em alguns casos, o peptídeo é desenhado, ou o polipeptídeo triado, para eliminar polipeptídeos tendo um neoepítomo juncional que tem a capacidade de se ligar a mais do que uma porcentagem limite de

indivíduos humanos em uma população com intenção de tratar, a pelo menos duas moléculas de HLA de classe I expressas por indivíduos da população individualmente. Em alguns casos, o limite é de 20%, ou 15%, ou 10%, ou 5%, ou 2%, ou 1%, ou 0,5% da referida população. O alinhamento pode ser determinado usando-se métodos conhecidos, tais como algoritmos BLAST. O *software* para conduzir análises BLAST está disponível publicamente através do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

[0096] A presença em uma composição de vacina ou de imunoterapia de pelo menos dois fragmentos de polipeptídeos (epítomos) que podem se ligar a pelo menos três HLA de um indivíduo ( $\text{PEPI3+} \geq 2$ ) foi determinada como sendo preditiva para uma resposta clínica. Em outras palavras, se  $\text{PEPI3+} \geq 2$  puder ser identificado no(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) de uma composição de vacina ou de imunoterapia, então um indivíduo é um provável respondedor clínico. Os pelo menos dois PEPIs que se ligam a múltiplos HLA dos polipeptídeos de composição podem ambos ter como alvo um único antígeno (por exemplo, uma vacina polipeptídica compreendendo dois PEPIs que se ligam a múltiplos HLA derivados de um único antígeno associado ao tumor que é alvo da vacina) ou podem ter como alvo antígenos diferentes (por exemplo, uma vacina polipeptídica



compreendendo um PEPI que se liga a múltiplos HLA derivado de um antígeno associado a um tumor e um segundo PEPI que se liga a múltiplos HLA derivado de um antígeno associado a um tumor diferente).

[0097] Sem pretenderem estar limitados pela teoria, os inventores acreditam que uma razão para o aumento da probabilidade de se obter benefício clínico de uma vacina/imunoterapia compreendendo pelo menos dois PEPIs que se ligam a múltiplos HLA é que as populações de células doentes, tais como células cancerígenas ou tumorais ou células infectadas por vírus ou por patógenos tais como o HIV, geralmente são heterogêneas tanto em um mesmo quanto entre indivíduos afetados. Um paciente específico com câncer, por exemplo, pode ou não expressar ou superexpressar um antígeno polipeptídico-alvo de uma vacina associado a um câncer em particular, ou seu câncer pode compreender populações celulares heterogêneas, algumas das quais (super)expressam o antígeno e outras, não. Além disso, a probabilidade de se desenvolver resistência é diminuída quando mais PEPIs que se ligam a múltiplos HLA são incluídos por ou quando são alvos de uma vacina/imunoterapia, pois um paciente tem menor probabilidade de desenvolver resistência à composição por meio de mutação do(s) PEPI(s)-alvo.

[0098] Atualmente, a maioria das vacinas e composições de imunoterapia tem como alvo apenas um único antígeno polipeptídico. No entanto, de acordo com a presente divulgação, em alguns casos é benéfico proporcionar uma composição farmacêutica que tem como alvos dois ou mais antígenos polipeptídicos diferentes. Por exemplo, a maioria dos cânceres ou tumores é heterogênea, o que significa que diferentes células cancerígenas ou tumorais de um indivíduo (super)expressam antígenos diferentes. As células tumorais de diferentes pacientes com câncer também expressam diferentes combinações de antígenos associados a tumores. As composições imunogênicas anticâncer que têm maior probabilidade de ser efetivas são as que têm como alvos múltiplos antígenos expressos pelo tumor e, portanto, mais células cancerígenas ou tumorais, em um indivíduo humano individualmente ou em uma população.

[0099] O efeito benéfico de se combinarem múltiplos bestEPis em um único tratamento (administração de uma ou mais composições farmacêuticas que, em conjunto, compreendem múltiplos PEPis) pode ser ilustrado pelos polipeptídeos de vacinas personalizados descritos nos Exemplos 15 e 16 abaixo. Exemplos de probabilidades de expressão de CTA em câncer de ovário são as seguintes: BAGE: 30%; MAGE A9: 37%; MAGE A4: 34%;

MAGE A10: 52%. Se a paciente XYZ fosse tratada com uma vacina compreendendo PEPIs apenas em BAGE e MAGE A9, então a probabilidade de ter um mAGP (múltiplos antígenos expressos com PEPI) seria de 11%. Se a paciente XYZ fosse tratada com uma vacina compreendendo apenas PEPIs para os CTAs MAGE A4 e MAGE A10, então a probabilidade de ter um multiAGP seria de 19%. No entanto, se uma vacina contivesse todos estes 4 CTAs (BAGE, MAGE A9, MAGE A4 e MAGE A10), então a probabilidade de ter um mAGP seria de 50%. Em outras palavras, o efeito seria maior do que as probabilidades combinadas de mAGP para ambos os tratamentos com dois PEPI (probabilidade mAGP para BAGE/MAGE + probabilidade mAGP para MAGE A4 e MAGE A10). A vacina PIT da paciente XYZ descrita no Exemplo 21 contém 9 PEPIs adicionais e, portanto, a probabilidade de ter um mAGP é maior do que 99,95%.

[00100] Da mesma maneira, exemplos de probabilidades de expressão de CTA e câncer de mama são as seguintes: MAGE C2: 21%; MAGE A1: 37%; SPC1: 38%; MAGE A9: 44%. Tratamento da paciente ABC com uma vacina compreendendo PEPIs apenas em MAGE C2: 21% e MAGE A1 tem uma probabilidade de mAGP de 7%. Tratamento da paciente ABC com uma vacina compreendendo PEPIs apenas em SPC1: 38%; O MAGE A9 tem uma probabilidade de mAGP de 11%. Tratamento da paciente ABC com uma vacina compreendendo

PEPIs em MAGE C2: 21%; MAGE A1: 37%; SPC1: 38%; MAGE A9 tem uma probabilidade de mAGP de 44% ( $44 > 7 + 11$ ). A vacina PIT da paciente ABC descrita no Exemplo 22 contém 8 PEPIs adicionais e, portanto, a probabilidade de ter um mAGP é maior do que 99,93%.

[00101] Consequentemente, em alguns casos, o polipeptídeo ou painel de polipeptídeos da divulgação ou um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s) de uma composição farmacêutica ou kit da divulgação pode compreender ou consistir em qualquer combinação de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 fragmentos de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 do um ou mais antígenos associados a câncer, ou CTAs, tais como o CTA discutido acima. Cada fragmento compreende ou consiste em um epítopo-alvo diferente tendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das SEQ ID NOs: 1-40; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1 a 20; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21 a 40; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-20, 24 e 172-194; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21-40 e 234-250; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 272-301; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-40, 172-194 e 234-250; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21-40, 234-250 e 272-

301; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-20, 24, 172-194 e 272-301; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-40, 172-194, 234-250 e 272-301; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-60, 64 e 195-233; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 61-80 e 251-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 302-331; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-80, 195-233 e 251-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 61-80, 251-271 e 302 to 331; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-60, 64, 191-233 e 302 a 331; ou selecionado a partir de SEQ ID NOs: 41-80, 195-233, 251-271 e 332-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-20, 24, 41-60, 64, 172-194 e 195-233; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21-40, 61-80, 234-250 e 251-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 271-331; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-80, 172-194, 195-233, 234-250 e 251-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21-40, 61-80, 234-250, 251-271, 272-301 e 302-331; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-80, 172-233, 234-271 e 272-331; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 81-111 e 435-449; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 112-142; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 332-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 81-142; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 112-142 e 332-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 81-111, 435-449 e 332-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs:

81-142 e 332-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-60, 64, 81-111, 435-449 e 195-233; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 61-80, 112-142 e 251-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 302-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-142, 195-233 e 251-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 61-80, 112-142, 251-271 e 302-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-60, 64, 81-111, 435-449, 195-233 e 302-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 41-142, 195-233, 251-271 e 302-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-20, 24, 41-60, 64, 81-111, 435-449 e 172-233; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21-40, 61-80, 112-142, or 234-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 272-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-142 e 172-271; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 21-40, 61-80, 112-142 e 234-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-20, 24, 41-60, 64, 81-111, 435-449, 172-233 e 272 a 346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1-142 e 172-346; ou selecionado a partir das SEQ ID NOs: 1 a 2, ou a 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 7, ou 8, ou 9, ou 10, ou 11, ou 12, ou 13, ou 14, ou 15, ou 16, ou 17, ou 18, ou 19, ou SEQ ID NOs: 20 a 21, ou a 22, ou 23, ou 24, ou 25, ou 26, ou 27, ou 28, ou 29, ou 30, ou 31, ou 32, ou 33, ou 34, ou 35, ou 36, ou 37, ou 38, ou 39; ou sequências de aminoácidos diferentes selecionadas a partir das SEQ ID NOs: 41 a 80, ou SEQ ID NOs:

41 a 60, ou SEQ ID NOs: 61-80; ou SEQ ID NOs: 41 a 42, ou a 43, ou a 44, ou a 45, ou a 46, ou a 47, ou a 48, ou a 49, ou 50, ou 51, ou 52, ou 53, ou 54, ou 55, ou 56, ou 57, ou 58, ou 59, SEQ ID NOs: 60 a 61, ou a 62, ou a 63, ou a 64, ou a 65, ou a 66, ou a 67, ou a 68, ou a 69, ou a 70, ou a 71, ou a 72, ou a 73, ou a 74, ou a 75, ou a 76, ou a 77, ou a 78, ou a 79; uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 81 a 142; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 81 a 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, ou 111; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 81 a 105; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 99, 100, 92, 93, 101, 103, 104, 105 e 98; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 112 a 142; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 112 a 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141 ou 142; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 112 a 134; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 121, 124, 126, 127, 130, 131, 132, 133 e 134; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 1 a 2, ou a 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 7, ou 8, ou 9, ou 10, ou 11, ou 12, ou 13, ou 14, ou 15, ou 16, ou 17, ou 18, ou 19, ou SEQ ID NOs: 20 a 21, ou a 22, ou 23, ou 24, ou 25, ou 26, ou 27, ou 28, ou 29, ou 30, ou 31, ou 32, ou 33, ou 34,

ou 35, ou 36, ou 37, ou 38, ou 39; ou uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 41 a 80, ou SEQ ID NOs: 41 a 60, ou SEQ ID NOs: 61-80; ou SEQ ID NOs: 41 a 42, ou a 43, ou a 44, ou a 45, ou a 46, ou a 47, ou a 48, ou a 49, ou 50, ou 51, ou 52, ou 53, ou 54, ou 55, ou 56, ou 57, ou 58, ou 59, SEQ ID NOs: 60 a 61, ou a 62, ou a 63, ou a 64, ou a 65, ou a 66, ou a 67, ou a 68, ou a 69, ou a 70, ou a 71, ou a 72, ou a 73, ou a 74, ou a 75, ou a 76, ou a 77, ou a 78, ou a 79; uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 81 a 142; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 81 a 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, ou 111; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 81 a 105; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 99, 100, 92, 93, 101, 103, 104, 105 e 98; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 112 a 142; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 112 a 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141 ou 142; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 112 a 134; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 121, 124, 126, 127, 130, 131, 132, 133 e 134; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 130, 121, 131, 124, 134, 126; ou selecionada a partir de SEQ ID NOs: 435-449; ou



selecionado a partir de qualquer um destes grupos de sequências, exceto as SEQ ID NOs: 12, 32, 19 e/ou 39, e/ou SEQ ID NOs: 21, 41, 23 e/ou 43 e/ou SEQ ID NOs: 172, 177, 195 e/ou 203, e/ou SEQ ID NOs: 1, 41 e/ou 197, e/ou SEQ ID NOs: 4, 44 e/ou 201, e/ou SEQ ID NOs: 1, 4, 44, 197 e/ou 201, e/ou SEQ ID NOs: 1, 41, 197, 184 e/ou 212, e/ou SEQ ID NOs: 3, 43 e/ou 200, e/ou SEQ ID NOs: 3, 43, 200, 7 e/ou 47, e/ou SEQ ID NOs: 10, 50 e/ou 220, e/ou SEQ ID NOs: 24, 64 e/ou 202, e/ou SEQ ID NOs: 6, 46 e/ou 209, e/ou SEQ ID NOs: 182, 210, 185 e/ou 213, e/ou SEQ ID NOs: 14, 54, 225 e 226, e/ou SEQ ID NOs: 190, 218, 11, 51 e/ou 219, e/ou SEQ ID NOs: 12, 224 e/ou 52, e/ou SEQ ID NOs: 192, 227 e/ou 228, e/ou SEQ ID NOs: 17, 229, 230 e/ou 57, e/ou SEQ ID NOs: 21, 252, 61 e/ou 253, e/ou SEQ ID NOs: 23, 63 e/ou 256, e/ou SEQ ID NOs: 21, 252, 61, 253, 23, 63 e/ou 256, e/ou SEQ ID NOs: 237 e/ou 238, e/ou SEQ ID NOs: 26 e/ou 240, e/ou SEQ ID NOs: 242, 244, 263 e/ou 265, e/ou SEQ ID NOs: 29, 69 e/ou 259, e/ou SEQ ID NOs: 24, 64 e/ou 255, e/ou SEQ ID NOs: 236, 257 e/ou 258, e/ou SEQ ID NOs: 27, 67, 241 e/ou 262, e/ou SEQ ID NOs: 252, 249 e/ou 264, e/ou SEQ ID NOs: 35, 250 e/ou 75, e/ou SEQ ID NOs: 252, 249, 264, 35, 250 e/ou 75, e/ou SEQ ID NOs: 36, 266 e/ou 76, e/ou SEQ ID NOs: 36, 266, 76, 39 e/ou 79, e/ou SEQ ID NOs: 38, 268 e/ou 78, e/ou SEQ ID NOs: 38, 268, 78, 246 e/ou 270, e/ou SEQ ID NOs: 245, 269, e/ou 248, e/ou

SEQ ID NOs: 245, 269, 248, 40 e/ou 80, e/ou SEQ ID NOs: 272, 302, 281 e/ou 311, e/ou SEQ ID NOs: 276, 306, 300 e/ou 330, e/ou SEQ ID NOs: 276, 306, 289 e/ou 319, e/ou SEQ ID NOs: 277, 307, 283 e/ou 313, e/ou SEQ ID NOs: 277, 307, 290 e/ou 320, e/ou SEQ ID NOs: 282, 312, 297 e/ou 327, ou quaisquer outras combinações das sequências aqui divulgadas que estão entre 50-60 aminoácidos um do outro em qualquer um ou mais dos antígenos de SEQ ID NOs: 143-158 e 347 to 351; e/ou SEQ ID NOs: 18, 19 e/ou 20 e/ou SEQ ID NOs: 34-40; e/ou SEQ ID NOs correspondendo aos peptídeos mostrados na Tabela 17, 20 e/ou 23 tendo um valor de N%B% menor do que 12% ou 13% ou 14% ou 17,6% ou 17,8% ou 18% ou 20% ou 21% ou 22% ou 22,2% ou 24% ou 25% ou 27% ou 28% ou 30% ou 31% ou 31,5% ou 32% ou 32,5 % ou 35%. Em alguns casos, o painel de peptídeos compreende ou consiste em um ou mais polipeptídeos compreendendo ou consistindo nas sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 130, 121, 131, 124, 134, 126 e/ou SEQ ID NOs: 435-449.

[00102] Em alguns casos, a divulgação fornece um painel de quaisquer dois ou mais dos peptídeos ou grupos de peptídeos descritos acima. Por exemplo, o painel pode compreender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais de tais peptídeos. Em alguns casos, o painel compreende ou consiste em peptídeos compreendendo ou

consistindo em toda ou qualquer combinação das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 99, 100, 92, 93, 101, 103, 104, 105 e 98; ou das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 121, 124, 126, 127, 130, 131, 132, 133 e 134. Em alguns casos, o painel compreende ou consiste em peptídeos compreendendo ou consistindo em toda ou qualquer combinação das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: As SEQ ID NOs: 130, 121, 131, 124, 134, 126 e/ou SEQ ID NOs: 435-449.

Composições Farmacêuticas, Métodos de Tratamento e Modos de Administração

[00103] Em alguns aspectos, a divulgação refere-se a uma composição farmacêutica, kit ou painéis de polipeptídeos, conforme descritos acima, tendo um ou mais polipeptídeos como ingrediente(s) ativo(s). Estes podem ser usados em um método para induzir uma resposta imune, tratar, vacinar ou proporcionar imunoterapia a um indivíduo, e a composição farmacêutica pode ser uma composição de vacina ou de imunoterapia. Tal tratamento compreende administrar um ou mais polipeptídeos ou composições farmacêuticas que, em conjunto, compreendem todos os polipeptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s) do tratamento ao indivíduo. Múltiplos polipeptídeos ou composições farmacêuticas podem ser administrados juntos ou sequencialmente, por exemplo, todas as composições

farmacêuticas ou polipeptídeos podem ser administrados ao indivíduo dentro de um período de 1 ano, 6 meses, ou 3 meses, ou 60 ou 50 ou 40 ou 30 dias.

[00104] O termo "ingrediente ativo", conforme aqui usado, refere-se a um polipeptídeo que se destina a induzir uma resposta imune e pode incluir um produto polipeptídico de uma composição de vacina ou de imunoterapia que é produzida *in vivo* após administração a um indivíduo. Para uma composição de imunoterapia de DNA ou RNA, o polipeptídeo pode ser produzido *in vivo* pelas células de um indivíduo a quem a composição é administrada. Para uma composição baseada em células, o polipeptídeo pode ser processado e/ou apresentado por células da composição, por exemplo, células dendríticas autólogas ou células apresentadoras de antígeno pulsadas com o polipeptídeo ou compreendendo um construto de expressão que codifica o polipeptídeo. A composição farmacêutica pode compreender um polinucleotídeo ou célula que codificam um ou mais polipeptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s).

[00105] A composição/kit pode, opcional e adicionalmente, compreender pelo menos um diluente, veículo ou conservante farmacêuticamente aceitável e/ou polipeptídeos adicionais que não compreendam nenhum PEPI. Os polipeptídeos podem ser engenheirados ou de ocorrência não natural. O kit

pode compreender um ou mais recipientes separados, cada um contendo um ou mais peptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s). A composição/kit pode ser um medicamento personalizado para prevenir, diagnosticar, aliviar, tratar, ou curar uma doença de um indivíduo, tal como um câncer.

[00106] As composições ou kits, imunogênicos ou farmacêuticos, aqui descritos podem compreender, além de um ou mais peptídeos imunogênicos, um excipiente, veículo, diluente, tampão, estabilizador, conservante, adjuvante ou outros materiais farmacêuticamente aceitáveis, bem conhecidos dos especialistas na técnica. Tais materiais são preferencialmente não tóxicos e preferencialmente não interferem na atividade farmacêutica do(s) ingrediente(s) ativo(s). O veículo ou diluente farmacêuticos podem ser, por exemplo, uma solução contendo água. A natureza precisa do veículo ou de outro material pode depender da via de administração, por exemplo, vias oral, intravenosa, cutânea ou subcutânea, nasal, intramuscular, intradérmica e intraperitoneal.

[00107] As composições farmacêuticas da divulgação podem compreender um ou mais "veículos farmacêuticamente aceitáveis". Estes tipicamente são macromoléculas, grandes e metabolizadas lentamente, tais como proteínas, sacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos

poliméricos, copolímeros de aminoácidos, sacarose (Paoletti et al., 2001, Vaccine, 19:2118), trealose (WO 00/56365 ), lactose e agregados lipídicos (tais como gotículas de óleo ou lipossomos). Tais veículos são bem conhecidos dos especialistas na técnica. As composições farmacêuticas também podem conter diluentes, tais como água, solução salina, glicerol etc. Além disso, podem estar presentes substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsificantes, substâncias tamponantes de pH e semelhantes. A solução salina fisiológica tamponada com fosfato, isenta de pirógenos e estéril é um veículo típico (Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN:0683306472).

[00108] As composições farmacêuticas da divulgação podem estar liofilizadas ou na forma aquosa, isto é, de soluções ou suspensões. Formulações líquidas deste tipo permitem que as composições sejam administradas diretamente a partir de sua forma embalada, sem a necessidade de reconstituição em meio aquoso, e são, portanto, ideais para injeção. As composições farmacêuticas podem ser apresentadas em frascos, ou podem ser apresentadas em seringas preenchidas prontas. As seringas podem ser fornecidas com ou sem agulhas. Uma seringa incluirá uma dose única, ao passo que um frasco pode incluir uma dose única ou várias doses.

[00109] As formulações líquidas da divulgação também são adequadas para reconstituir outros medicamentos a partir de uma forma liofilizada. Quando uma composição farmacêutica for usada para tal reconstituição extemporânea, a divulgação proporciona um kit, o qual pode compreender dois frascos, ou o qual pode compreender uma seringa preenchida pronta e um frasco, com o conteúdo da seringa sendo usado para reconstituir o conteúdo do frasco antes da injeção.

[00110] As composições farmacêuticas da divulgação podem incluir um antimicrobiano, particularmente quando embaladas em um formato de dose múltipla. Podem ser usados antimicrobianos, tais como 2-fenoxietanol ou parabenos (metil, etil, propilparabenos). Qualquer conservante está preferencialmente presente em níveis baixos. O conservante pode ser adicionado exogenamente e/ou pode ser um componente dos antígenos em massa que são misturados para formar a composição (por exemplo, presente como conservante nos antígenos de pertússis).

[00111] As composições farmacêuticas da divulgação podem compreender detergente, por exemplo, Tween (polissorbato), DMSO (dimetilsulfóxido), DMF (dimetilformamida). Os detergentes geralmente estão presentes em níveis baixos, por exemplo, <0,01%, mas também podem ser

usados em níveis mais altos, por exemplo, 0,01 - 50%.

[00112] As composições farmacêuticas da divulgação podem incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) e íons fosfato livres em solução (por exemplo, pelo uso de um tampão fosfato).

[00113] Em certas modalidades, a composição farmacêutica pode ser encapsulada em um veículo adequado ou para distribuir os peptídeos nas células apresentadoras de antígeno ou para aumentar a estabilidade. Como será entendido por um especialista na técnica, uma variedade de veículos é adequada para distribuir uma composição farmacêutica da divulgação. Exemplos não limitantes de sistemas de distribuição de fluidos estruturados adequados podem incluir nanopartículas, lipossomos, microemulsões, micelas, dendrímeros e outros sistemas contendo fosfolipídios. São conhecidos na técnica métodos de incorporação de composições farmacêuticas em veículos de distribuição.

[00114] A fim de se aumentar a imunogenicidade da composição, as composições farmacológicas podem compreender um ou mais adjuvantes e/ou citocinas.

[00115] Os adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio, tais como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, mas também pode ser um sal de cálcio, ferro ou zinco,



ou pode ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada, ou açúcares acilados, ou podem ser sacarídeos derivados catiônica ou anionicamente, polifosfazenos, microesferas biodegradáveis, monofosforil-lipídio A (MPL), derivados do lipídio A (por exemplo, de toxicidade reduzida), MPL 3-O-desacetilado [3D-MPL], quil A, Saponina, QS21, Adjuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA), Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ, EUA), AS-2 (Smith-Kline Beecham, Filadélfia, Pensilvânia, EUA), oligonucleotídeos de CpG, bioadesivos e mucoadesivos, micropartículas, lipossomos, formulações de éter de polioxietileno, formulações de ésteres de polioxietileno, peptídeos de muramil ou compostos de imidazoquinolona (por exemplo, imiquamod e seus homólogos). Também podem ser usados como adjuvantes imunomoduladores humanos adequados para uso como adjuvantes na divulgação que incluem citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 etc.), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).

[00116] Em algumas modalidades, as composições compreendem um adjuvante selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51 (Seppic, Inc., Fairfield, NJ, Estados Unidos

da América), QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Lexington, Mass., Estados Unidos da América), GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinisona, dinitroclorobenezeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH, do inglês "lapa do buraco da fechadura"), adjuvante de Freund (completo e incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT).

[00117] A título de exemplo, a citocina pode ser selecionada do grupo consistindo em um fator de crescimento transformador (TGF), tais como, mas não limitados a, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ; fator de crescimento tipo insulina I e/ou fator de crescimento tipo insulina II; eritropoietina (EPO); um fator osteoindutor; um interferon, tais como mas não limitados a, interferon- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\gamma$ ; um fator estimulador de colônias (CSF), tais como mas não, limitados a, CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); e CSF de granulócitos (G-CSF). Em algumas modalidades, a citocina é selecionada do grupo que consistindo em fatores de crescimento de nervos, tal como NGF- $\beta$ ; fator de crescimento de plaquetas; um fator de crescimento transformador (TGF), tais como, mas não limitados

a, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ; fator de crescimento tipo insulina I e fator de crescimento tipo insulina II; eritropoietina (EPO); um fator osteoindutor; um interferon (IFN), tais como, mas não limitados a, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ; um fator estimulador de colônias (CSF), como macrófago-CSF (M-CSF); CSF de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); e CSF de granulócitos (G-CSF); uma interleucina (Il), tais como, mas não limitadas a, IL-1, IL-1.afa., IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18; LIF; ligante do kit ou FLT-3; angiostatina; trombospondina; endostatina; um fator de necrose tumoral (TNF); e LT.

[00118] Espera-se que um adjuvante ou citocina possam ser adicionados em uma quantidade de cerca de 0,01 mg a cerca de 10 mg por dose, preferencialmente em uma quantidade de cerca de 0,2 mg a cerca de 5 mg por dose. Alternativamente, o adjuvante ou citocina podem estar a uma concentração de cerca de 0,01 a 50%, preferencialmente a uma concentração de cerca de 2% a 30%.

[00119] Em certos aspectos, as composições farmacêuticas da divulgação são preparadas misturando-se fisicamente o adjuvante e/ou a citocina com os peptídeos da divulgação sob condições estéreis apropriadas, de acordo com técnicas conhecidas para se produzir o produto final.

[00120] Exemplos de composições adequadas dos fragmentos polipeptídicos inventados e métodos de administração são fornecidos em Esseku e Adeyeye (2011) e Van den Mooter G. (2006). A preparação da composição de vacina e de imunoterapia é descrita em termos gerais em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J. (1995) Plenum Press New York). O encapsulamento dentro dos lipossomos, que também está previsto, é descrito por Fullerton, Patente US 4.235.877.

[00121] Em algumas modalidades, as composições aqui divulgadas são preparadas como uma vacina de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a vacina de ácido nucleico é uma vacina de DNA. Em algumas modalidades, as vacinas de DNA, ou vacinas de genes, compreendem um plasmídeo com um promotor e elementos de controle de transcrição e de tradução apropriados e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais polipeptídeos da divulgação. Em algumas modalidades, os plasmídeos também incluem sequências para melhorar, por exemplo, níveis de expressão, direcionamento intracelular ou processamento proteassomal. Em algumas modalidades, as vacinas de DNA compreendem um vetor viral contendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais polipeptídeos da divulgação. Em aspectos adicionais, as composições aqui

divulgadas compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam peptídeos que se determinou que têm imunorreatividade com uma amostra biológica. Por exemplo, em algumas modalidades, as composições compreendem uma ou mais sequências de nucleotídeos que codificam 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais peptídeos compreendendo um fragmento que é um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I e/ou a pelo menos três moléculas de HLA de classe II de um paciente. Em algumas modalidades, os peptídeos são derivados de um antígeno que é expresso no câncer. Em algumas modalidades, a vacina de DNA ou de genes também codifica moléculas imunomodulatórias para manipular as respostas imunes resultantes, tal como aumentar a potência da vacina, estimular o sistema imune ou reduzir a imunossupressão. Estratégias para melhorar a imunogenicidade de vacinas de DNA ou de genes incluem codificar versões xenogênicas de antígenos, a fusão de antígenos a moléculas que ativam células T ou desencadeiam o reconhecimento associativo, iniciando-se ("priming") com vetores de DNA e prosseguindo-se com reforço ("boosting") com vetor viral, e utilização de moléculas imunomodulatórias. Em algumas modalidades, a vacina de DNA é introduzida por uma agulha, uma pistola de genes, um injetor

de aerossol, com adesivos, através de microagulhas, por abrasão, entre outras formas. Em algumas formas, a vacina de DNA é incorporada em lipossomos ou em outras formas de nanocorpos. Em algumas modalidades, a vacina de DNA inclui um sistema de distribuição selecionado do grupo consistindo em um agente de transfecção; protamina; um lipossomo de protamina; uma partícula de polissacarídeo; uma nanoemulsão catiônica; um polímero catiônico; um lipossomo catiônico de polímero; uma nanopartícula catiônica; uma nanopartícula catiônica de lipídios e colesterol; uma nanopartícula catiônica de lipídios, colesterol e PEG; uma nanopartícula de dendrímero. Em algumas modalidades, as vacinas de DNA são administradas por inalação ou ingestão. Em algumas modalidades, a vacina de DNA é introduzida no sangue, no timo, no pâncreas, na pele, no músculo, em um tumor ou em outros locais.

[00122] Em algumas modalidades, as composições aqui divulgadas são preparadas como uma vacina de RNA. Em algumas modalidades, o RNA é mRNA não replicante ou RNA autoamplificador derivado de vírus. Em algumas modalidades, o mRNA não replicante codifica os peptídeos aqui divulgados e contém regiões não traduzidas 5' e 3' (UTRs, do inglês "untranslated regions"). Em algumas modalidades, o RNA autoamplificador derivado de vírus codifica não apenas os

peptídeos aqui divulgados, mas também a maquinaria de replicação viral que permite a amplificação intracelular de RNA e expressão abundante de proteínas. Em algumas modalidades, o RNA é introduzido diretamente no indivíduo. Em algumas modalidades, o RNA é quimicamente sintetizado ou transcrito *in vitro*. Em algumas modalidades, o mRNA é produzido a partir de um molde linear de DNA usando-se uma polimerase de RNA de T7, T3 ou de fago Sp6, e o produto resultante contém uma fase de leitura aberta que codifica os peptídeos aqui divulgados, flanqueando UTRs, um "cap" 5' e uma cauda de poli(A). Em algumas modalidades, várias versões de "caps" 5' são adicionadas durante ou após a reação de transcrição usando-se uma enzima de adição do "cap" ("capping") do vírus vaccinia ou incorporando-se análogos sintéticos do "cap" ou antirreversos do "cap". Em algumas modalidades, um comprimento ideal da cauda de poli(A) é adicionado ao mRNA ou diretamente a partir do molde de DNA codificador ou usando-se a poli(A) polimerase. O RNA codifica um ou mais peptídeos compreendendo um fragmento que é um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I e/ou a pelo menos três moléculas de HLA de classe II de um paciente. Em algumas modalidades, os fragmentos são derivados de um antígeno que é expresso no câncer. Em algumas modalidades, o RNA inclui

sinais para melhorar a estabilidade e a tradução. Em algumas modalidades, o RNA também inclui nucleotídeos não naturais para aumentar a meia-vida ou nucleosídeos modificados para alterar o perfil imunoestimulatório. Em algumas modalidades, os RNAs são introduzidos por uma agulha, uma pistola de genes, um injetor de aerossol, com adesivos, através de microagulhas, por abrasão, entre outras formas. Em algumas formas, a vacina de RNA é incorporada em lipossomos ou em outras formas de nanocorpos que facilitam a absorção celular de RNA e que o protegem da degradação. Em algumas modalidades, a vacina de RNA inclui um sistema de distribuição selecionado do grupo consistindo em um agente de transfecção; protamina; um lipossomo de protamina; uma partícula de polissacarídeo; uma nanoemulsão catiônica; um polímero catiônico; um lipossomo de polímero catiônico; uma nanopartícula catiônica; uma nanopartícula catiônica de lipídios e colesterol; uma nanopartícula catiônica de lipídios, colesterol e PEG; uma nanopartícula de dendrímero; e/ou mRNA nu; mRNA nu com eletroporação *in vivo*; mRNA complexado com protamina; mRNA associado a uma nanoemulsão catiônica de óleo em água com carga positiva; mRNA associado a um dendrímero quimicamente modificado e complexado com polietilenoglicol (PEG)-lipídio; mRNA complexado com protamina em uma nanopartícula de PEG-



lipídio; mRNA associado a um polímero catiônico, tal como polietilenimina (PEI); mRNA associado a um polímero catiônico tal como PEI e um componente lipídico; mRNA associado a uma partícula ou gel de polissacarídeo (por exemplo, quitosana); mRNA em uma nanopartícula catiônica de lipídios (por exemplo, lipídios de 1,2-dioleoilóxi-3-trimetilamoniopropano (DOTAP) ou de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)); mRNA complexado com lipídios catiônicos e colesterol; ou mRNA complexado com lipídios catiônicos, colesterol e PEG-lipídio. Em algumas modalidades, as vacinas de RNA são administradas por inalação ou ingestão. Em algumas modalidades, o RNA é introduzido no sangue, no timo, no pâncreas, na pele, no músculo, em um tumor, ou em outros locais, e/ou por uma via intradérmica, intramuscular, subcutânea, intranasal, intranodal, intravenosa, intraesplênica, intratumoral ou outra via de distribuição.

[00123] Os componentes polinucleotídicos ou oligonucleotídicos podem ser sequências nucleotídicas nuas, ou podem estar em combinação com lipídios, polímeros ou sistemas de direcionamento catiônicos. Eles podem ser liberados por qualquer técnica disponível. Por exemplo, o polinucleotídeo ou oligonucleotídeo pode ser introduzido por injeção com agulha, preferencialmente por via intradérmica, subcutânea ou

intramuscular. Alternativamente, o polinucleotídeo ou oligonucleotídeo pode ser liberado diretamente através da pele usando-se um dispositivo de liberação, tal como liberação/distribuição de genes mediada por partículas. O polinucleotídeo ou oligonucleotídeo pode ser administrado topicamente à pele, ou às superfícies mucosas, por exemplo, por administração intranasal, oral ou intrarretal.

[00124] A absorção de construtos polinucleotídicos ou oligonucleotídicos pode ser melhorada por várias técnicas de transfecção conhecidas, por exemplo aquelas que incluem o uso de agentes de transfecção. Exemplos destes agentes incluem agentes catiônicos, por exemplo, fosfato de cálcio e DEAE-Dextran e lipofectantes, por exemplo, lipofectam e transfectam. A dosagem do polinucleotídeo ou oligonucleotídeo a ser administrado pode ser alterada.

[00125] A administração é tipicamente uma "quantidade profilaticamente efetiva" ou uma "quantidade terapeuticamente efetiva" (conforme o caso, embora profilaxia possa ser considerada terapia), sendo isto suficiente para resultar em uma resposta clínica ou mostrar benefício clínico ao indivíduo, por exemplo, uma quantidade efetiva para prevenir ou retardar o início da doença ou condição, melhorar um ou mais sintomas, induzir ou prolongar a remissão, ou retardar a recaída ou

recorrência.

[00126] A dose pode ser determinada de acordo com vários parâmetros, especialmente de acordo com a substância usada; a idade, peso e condição do indivíduo a ser tratado; a via de administração; e o regime necessário. A quantidade de antígeno em cada dose é selecionada como uma quantidade que induz uma resposta imune. Um médico será capaz de determinar a via de administração e dosagem necessárias para qualquer doente em particular. A dose pode ser proporcionada como uma dose única ou pode ser proporcionada como doses múltiplas, por exemplo, tomadas em intervalos regulares, por exemplo 2, 3 ou 4 doses administradas por hora. Tipicamente, peptídeos, polinucleotídeos ou oligonucleotídeos são tipicamente administrados na faixa de 1 pg a 1 mg, mais tipicamente 1 pg a 10 µg para liberação/distribuição mediada por partículas e 1 µg a 1 mg, mais tipicamente 1-100 µg, mais tipicamente 5-50 µg para outras vias. Geralmente, espera-se que cada dose compreenda 0,01-3 mg de antígeno. Uma quantidade ideal para uma vacina específica pode ser determinada por estudos envolvendo a observação de respostas imunes em indivíduos.

[00127] Exemplos das técnicas e protocolos mencionados acima podem ser encontrados em Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams &

Wilkins.

[00128] Em alguns casos, de acordo com a divulgação, são administrados mais de um peptídeo ou composição de peptídeos. Duas ou mais composições farmacêuticas podem ser administradas juntas/simultaneamente e/ou em momentos diferentes ou sequencialmente. Assim, a divulgação inclui conjuntos de composições farmacêuticas e usos dos mesmos. O uso da combinação de diferentes peptídeos, tendo opcionalmente como alvos diferentes antígenos, é importante para superar os desafios da heterogeneidade genética de tumores e da heterogeneidade de HLA dos indivíduos. O uso de peptídeos da divulgação em combinação expande o grupo de indivíduos que podem experimentar benefício clínico da vacinação. Várias composições farmacêuticas de peptídeos da divulgação, fabricadas para uso em um regime, podem definir um produto com o fármaco.

[00129] As vias de administração incluem, mas não estão limitadas a, intranasal, oral, subcutânea, intradérmica, e intramuscular. A administração subcutânea é particularmente preferida. A administração subcutânea pode, por exemplo, ser por injeção no abdômen, aspectos laterais e anteriores do braço ou da coxa, área escapular das costas, ou área glútea ventrodorsal superior.

[00130] As composições da divulgação também podem ser administradas em uma, ou mais doses, assim como por outras vias de administração. Por exemplo, essas outras vias incluem intracutânea, intravenosa, intravascular, intra-arterial, intraperitoneal, intratecal, intratraqueal, intracardiaca, intralobal, intramedular, intrapulmonar, e intravaginal. Dependendo da duração do tratamento desejada, as composições de acordo com a divulgação podem ser administradas uma ou várias vezes, também de forma intermitente, por exemplo, mensalmente durante vários meses ou anos e em diferentes dosagens.

[00131] As formas de dosagem sólidas para administração oral incluem cápsulas, comprimidos, cápsulas de gel ("caplets"), pílulas, pós, drágeas, e grânulos. Em tais formas de dosagem sólidas, o ingrediente ativo é normalmente combinado com um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis, cujos exemplos são detalhados acima. As preparações orais também podem ser administradas como suspensões aquosas, elixires, ou xaropes. Para estas, o ingrediente ativo pode ser combinado com vários agentes adoçantes ou aromatizantes, corantes e, se desejado, agentes emulsificantes e/ou de suspensão, assim como com diluentes tais como água, etanol, glicerina e uma combinação dos mesmos.

[00132] Uma ou mais composições da divulgação podem ser administradas, ou os métodos e usos para o tratamento de acordo com a divulgação podem ser realizados, sozinhos ou em combinação, com outras composições farmacológicas ou tratamentos, por exemplo quimioterapia e/ou imunoterapia e/ou vacina. As outras composições terapêuticas ou tratamentos podem ser, por exemplo, um ou mais daqueles aqui discutidos e podem ser administrados quer simultânea quer sequencialmente com (antes ou depois) a composição ou tratamento da divulgação.

[00133] Em alguns casos, o tratamento pode ser administrado em combinação com terapia de bloqueio de ponto de verificação/inibidores de ponto de verificação, anticorpos coestimulatórios, quimioterapia citotóxica ou não citotóxica e/ou radioterapia, terapia direcionada ou terapia com anticorpos monoclonais. Foi demonstrado que a quimioterapia sensibiliza os tumores a serem mortos pelas células T citotóxicas específicas para tumores induzidas pela vacinação (Ramakrishnan *et al.* *J Clin Invest.* 2010; 120(4):1111-1124). Exemplos de inibidores de ponto de verificação são inibidores de CTLA-4, Ipilimumab e inibidores de sinalização de morte celular programada-1/ligante ("ligand") de morte celular programada-1 (PD-1/PD-L1), Nibolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab e Durvalumab. Exemplos de agentes quimioterápicos

incluem agentes alquilantes, incluindo mostardas de nitrogênio, tais como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano (L-sarcolisina) e clorambucil; antraciclina; epotilonas; nitrosoureas, tais como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) e estreptozocina (estreptozotocina); triazenos, tal como a decarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida; etileniminas/metilmelaminas, tais como hexametilmelamina, tiotepa; alquilsulfonatos, tal como bussulfano; antimetabólitos incluindo análogos de ácido fólico, tal como metotrexato (ametofterina); agentes alquilantes, antimetabólitos, análogos de pirimidina, tais como fluorouracila (5-fluorouracila; 5-FU), floxuridina (fluorodeoxiuridina; FUdR) e citarabina (citosina arabinosídeo); análogos de purina e inibidores relacionados, tais como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) e pentostatina (2'-desoxicoformicina); epipodofilotoxinas; enzimas, tal como L-asparaginase; modificadores de resposta biológica, tais como IFN $\alpha$ , IL-2, G-CSF e GM-CSF; complexos de coordenação de platina, tais como cisplatina (cis-DDP), oxaliplatina e carboplatina; antracenodionas, tais como mitoxantrona e antraciclina; ureia substituída, tal como hidroxiureia; derivados de metil-

hidrazina, incluindo procarbazona (N-metil-hidrazina, MIH) e procarbazona; supressores adrenocorticais, tais como mitotano (o,p'-DDD) e aminoglutetimida; taxol e análogos/derivados; hormônios e agonistas/antagonistas, incluindo antagonistas de adrenocorticosteroides, tais como prednisona e equivalentes, dexametasona e aminoglutetimida, progestina, tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona e acetato de megestrol, estrogênio, tais como dietilestilbestrol e equivalentes de etinil estradiol, antiestrogênio, tal como tamoxifeno, andrógenos, incluindo propionato de testosterona e fluoximesterona/equivalentes, antiandrógenos, tal como flutamida, análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas e leuprolida e antiandrógenos não esteroidais, tal como flutamida; produtos naturais, incluindo alcaloides da vinca, como vinblastina (VLB) e vincristina, epipodofilotoxinas, tais como etoposídeo e teniposídeo, antibióticos, tais como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorrubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) e mitomicina (mitomicina C), enzimas, tal como a L-asparaginase, e modificadores de resposta biológica, tais como interferon alfa.

[00134] Em alguns casos, o método de tratamento é um método de vacinação ou um método de proporcionar imunoterapia.



Como aqui usada, "imunoterapia" é o tratamento de uma doença ou condição ao se induzir ou melhorar uma resposta imune em um indivíduo. Em certas modalidades, imunoterapia refere-se a uma terapia que compreende a administração de um ou mais fármacos a um indivíduo para eliciar respostas de células T. Em uma modalidade específica, imunoterapia refere-se a uma terapia que compreende a administração ou expressão de polipeptídeos que contêm um ou mais PEPs a um indivíduo para eliciar uma resposta de células T para reconhecer e matar células que exibem um ou mais PEPs em sua superfície celular em conjunto com um HLA de classe I. Em uma outra modalidade específica, a imunoterapia compreende a administração de um ou mais PEPs a um indivíduo para eliciar uma resposta de células T citotóxicas contra células que exibem antígenos associados a tumores (TAAs) ou antígenos de câncer/testículo (CTAs) compreendendo os um ou mais PEPs em sua superfície celular. Em outra modalidade, imunoterapia refere-se a uma terapia que compreende a administração ou expressão de polipeptídeos que contêm um ou mais PEPs apresentados por HLAs de classe II a um indivíduo para eliciar uma resposta de T auxiliares para proporcionar coestimulação a células T citotóxicas que reconhecem e matam células doentes que exibem o um ou mais PEPs em sua superfície celular em conjunto com HLAs de classe I. Ainda em uma outra

modalidade específica, imunoterapia refere-se a uma terapia que compreende a administração de um ou mais fármacos a um indivíduo que reativam as células T existentes de modo que matem células-alvo. A teoria é que a resposta de células T citotóxicas eliminará as células que exibem um ou mais PEPs, melhorando, assim, a condição clínica do indivíduo. Em alguns casos, a imunoterapia pode ser usada para tratar tumores. Em outros casos, a imunoterapia pode ser usada para tratar doenças ou transtornos intracelulares baseados em patógenos.

[00135] Em alguns casos, a divulgação refere-se ao tratamento de câncer ou ao tratamento de tumores sólidos. Em alguns casos, o tratamento é de câncer de mama, câncer de ovário ou câncer colorretal. Em outros casos, o tratamento pode ser de qualquer outro câncer ou tumor sólido que expresse um antígeno associado ao tumor-alvo dos peptídeos presentes, como aqui descrito, ou qualquer câncer no qual tais antígenos polipeptídicos-alvo sejam expressos em alguns ou em uma alta porcentagem de indivíduos. O tratamento pode ser de cânceres ou tumores malignos ou benignos de qualquer tipo de célula, tecido ou órgão. O câncer pode ou não ser metastático. Exemplos de cânceres incluem carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemias, tumores de células germinativas ou blastomas. O câncer pode ou não ser um câncer relacionado a ou dependente de hormônios (por

exemplo, um câncer relacionado a estrogênio ou andrógeno).

Seleção de polipeptídeos e pacientes

[00136] Antígenos polipeptídicos específicos, e peptídeos particularmente curtos derivados de tais antígenos que são comumente usados em vacinação e imunoterapia, induzem respostas imunes em apenas uma fração dos indivíduos humanos. Os polipeptídeos da presente divulgação são selecionados especificamente para induzirem respostas imunes em uma grande proporção da população em geral, mas podem não ser eficazes em todos os indivíduos devido à heterogeneidade do genótipo de HLA. A heterogeneidade da população do genótipo de HLA significa que a taxa de resposta imune ou clínica às vacinas aqui descritas diferirá entre subpopulações humanas diferentes. Em alguns casos, as vacinas aqui descritas são para uso no tratamento de uma subpopulação específica ou alvo, por exemplo, uma população asiática, ou uma população vietnamita, chinesa e/ou japonesa.

[00137] A divulgação também proporciona um método para identificar um indivíduo humano que provavelmente terá uma resposta de células T citotóxicas à administração de uma composição farmacêutica compreendendo um peptídeo da divulgação (prováveis respondedores) ou para prever a probabilidade com que um indivíduo tenha uma resposta de

células T citotóxicas.

[00138] Como aqui proporcionado, a apresentação de epítomos de células T por múltiplos HLAs de um indivíduo é geralmente necessária para desencadear uma resposta de células T. O melhor preditor de uma resposta de células T citotóxicas a um dado polipeptídeo, conforme determinado pelos inventores, é a presença de pelo menos um epítomo de células T que é apresentado por três ou mais moléculas de HLA de classe I de um indivíduo ( $PEPI3+ \geq 1$ ). Consequentemente, a presença nos peptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s) de uma composição farmacêutica de um ou mais epítomos de células T que tenham a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de um indivíduo é preditiva de que o indivíduo terá uma resposta de células T citotóxicas à administração da composição farmacêutica. O indivíduo é um provável respondedor imune.

[00139] Em alguns casos, o epítomo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA d classe I do indivíduo tem a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 40, ou SEQ ID NOs: 1 a 40, 172-194, 234-250 e 272-301. Em outros casos, o epítomo de células T pode ter uma sequência de aminoácidos diferente em um ou mais peptídeos da composição farmacêutica.

[00140] Os inventores descobriram adicionalmente que a

presença em uma composição de vacina ou de imunoterapia de pelo menos dois epítomos que podem se ligar a pelo menos três HLA de um indivíduo é preditiva de uma resposta clínica. Em outras palavras, se um indivíduo tiver um total de PEPI3+  $\geq 2$  no(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) de uma composição de vacina ou de imunoterapia, e estes PEPI3+s forem derivados de sequências de antígenos que são, de fato, expressas no indivíduo (por exemplo, células do tumor-alvo do indivíduo expressam os antígenos associados ao tumor alvo), então o indivíduo é um provável respondedor clínico (isto é, um respondedor imune clinicamente relevante).

[00141] Consequentemente, alguns aspectos da divulgação referem-se a um método para identificar um indivíduo que provavelmente terá uma resposta clínica a um método de tratamento de acordo com a divulgação, ou para prever a probabilidade de que um indivíduo terá uma resposta clínica. Uma "resposta clínica" ou "benefício clínico", conforme aqui usados, podem ser a prevenção de ou um atraso no aparecimento de uma doença ou condição, a melhora de um ou mais sintomas, a indução ou prolongamento de remissão, ou o atraso de um recaída ou recorrência ou deterioração, ou qualquer outra melhora ou estabilização no status da doença de um indivíduo. Quando apropriado, uma "resposta clínica" pode se correlacionar com o

"controle da doença" ou uma "resposta objetiva", conforme definido pelas diretrizes dos Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST, do inglês "Response Evaluation Criteria In Solid Tumors").

[00142] Em algumas modalidades, o método compreende determinar que um ou mais antígenos associados a câncer selecionados dentre SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-85, TSP50, EpCAM, CAGE1, FBXO39, MAGE-A8 e MAGE-A6 são expressos por um câncer. Por exemplo, a expressão do antígeno associado a câncer pode ser detectada em uma amostra obtida do indivíduo, por exemplo, uma biópsia de tumor, usando-se métodos conhecidos na técnica.

[00143] Os inventores descobriram que não é suficiente que uma composição de vacina ou imunoterapia tenha como alvo um antígeno expresso por células cancerígenas ou tumorais de um paciente, nem que as sequências-alvo desse antígeno possam se ligar a HLA de classe I do paciente (epítomos restritos a HLA). A composição provavelmente é efetiva apenas em pacientes que tanto expressarem o antígeno-alvo quanto tiverem três ou mais HLA de classe I que se ligam a um único epítopo de células T do antígeno-alvo. Além disso, como descrito acima, pelo menos dois epítomos que se ligam a pelo menos 3 HLAs do paciente são geralmente necessários para se induzir uma resposta imune

cl clinicamente relevante.

[00144] Portanto, o método compreende adicionalmente determinar que o(s) peptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica compreende(m) duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é a) um fragmento de um antígeno associado a câncer expresso por células cancerígenas do indivíduo, determinado como descrito acima; e b) um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I do indivíduo.

[00145] Em alguns casos, o epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA d classe I do indivíduo tem a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 40, ou SEQ ID NOs: 1 a 40, 172-194, 234-250 e 272-301. Em outros casos, o epítipo de células T pode ter uma sequência de aminoácidos diferente em um ou mais peptídeos da composição farmacêutica.

[00146] Em alguns casos, a probabilidade de um indivíduo ter uma resposta clínica a uma vacina peptídica ou composição de imunoterapia, tais como as descritas aqui, pode ser determinada sem se saber se os antígenos-alvo são expressos em células cancerígenas ou tumorais do indivíduo e/ou sem se determinar o genótipo de HLA de classe I do indivíduo. Frequências de expressão de antígeno conhecidas na doença (por

exemplo, MAGE-A3 em um tipo de tumor como câncer de mama ou câncer colorretal) e/ou frequências conhecidas para o genótipo de HLA de classe I e da classe II de indivíduos na população-alvo (por exemplo, população étnica, população em geral, população doente) podem ser usadas em seu lugar. Além disso, combinando-se peptídeos que têm como alvos os PEPs mais frequentemente apresentados em toda a população (BestEPs) em múltiplos antígenos-alvo frequentemente expressos na doença, conforme identificados e descritos aqui, é possível desenhar um regime de vacina contra câncer que seja efetiva para uma grande proporção de pacientes. No entanto, usar os métodos de diagnóstico complementares aqui descritos para pré-selecionar pacientes com a maior probabilidade de ter uma resposta clínica aumentará as taxas de resposta clínica entre os pacientes tratados.

[00147] A probabilidade de que um indivíduo responderá ao tratamento é aumentada (i) pela presença de mais PEPs que se ligam a múltiplos HLA nos polipeptídeos do(s) ingrediente(s) ativo(s); (ii) pela presença de PEPs em mais antígenos polipeptídicos-alvo; e (iii) pela expressão dos antígenos polipeptídicos-alvo no indivíduo ou nas células doentes do indivíduo. Em alguns casos, a expressão dos antígenos polipeptídicos-alvo no indivíduo pode ser conhecida, por



exemplo, se os antígenos polipeptídicos-alvo estiverem em uma amostra obtida do indivíduo. Em outros casos, a probabilidade de um indivíduo específico, ou células doentes de um indivíduo específico, (super)expressarem uma combinação específica ou qualquer combinação de antígenos polipeptídicos-alvo pode ser determinada usando-se dados de frequência de expressão na população, por exemplo, probabilidade de expressão de um antígeno em câncer de mama, câncer colorretal ou câncer de ovário. Os dados de frequência de expressão na população podem estar relacionados a uma população correspondente ao indivíduo e/ou à doença ou à população com intenção de tratar. Por exemplo, a frequência ou probabilidade de expressão de um antígeno em particular associado a câncer em um câncer em particular ou indivíduo tendo um câncer em particular, por exemplo, câncer de mama, pode ser determinada detectando-se o antígeno no tumor, por exemplo, em amostras de tumor de câncer de mama. Em alguns casos, tais frequências de expressão podem ser determinadas a partir de números publicados e publicações científicas. Em alguns casos, um método da invenção compreende uma etapa para determinar a frequência de expressão de um antígeno polipeptídico-alvo relevante em uma população relevante.

[00148] É divulgada uma série de biomarcadores

farmacodinâmicos para predizer a atividade/efeito de vacinas em indivíduos humanos individualmente, assim como em populações de indivíduos humanos. Estes biomarcadores agilizam o desenvolvimento de vacinas mais efetivas e também diminuem o custo de desenvolvimento e podem ser usados para avaliar e comparar diferentes composições. Exemplos de biomarcadores são os seguintes.

[00149]    **AG95 - potência de uma vacina:** O número de antígenos em uma vacina contra câncer que um tipo específico de tumor expressa com 95% de probabilidade. O AG95 é um indicador da potência da vacina e é independente da imunogenicidade dos antígenos da vacina. O AG95 é calculado a partir dos dados da taxa de expressão de antígenos tumorais. Tais dados podem ser obtidos a partir de experimentos publicados em revistas científicas revisadas por pares. Tecnicamente, o AG95 é determinado a partir da distribuição binomial de antígenos na vacina levando-se em consideração todas as variações e taxas de expressão possíveis.

[00150]    **Contagem de PEPI3+ - imunogenicidade de uma vacina em um indivíduo:** Os PEPI3+ derivados de uma vacina são epítomos pessoais que se ligam a pelo menos 3 HLAs de um indivíduo e induzem respostas de células T. Os PEPI3+ podem ser determinados usando-se o Teste PEPI3+ em indivíduos cujo

genótipo HLA completo de 4 dígitos seja conhecido.

[00151] **Contagem de AP - antigenicidade de uma vacina em um indivíduo:** Número de antígenos da vacina com PEPI3+. As vacinas contêm sequências de antígenos polipeptídicos-alvo expressos por células doentes. A contagem de AP é o número de antígenos na vacina que contêm PEPI3+ e a contagem de AP representa o número de antígenos na vacina que podem induzir respostas de células T em um indivíduo. A contagem de AP caracteriza as respostas de células T específicas para os antígenos da vacina do indivíduo, uma vez ela que depende apenas do genótipo de HLA do indivíduo e é independente da doença, idade e medicação do indivíduo. O valor correto está entre 0 (nenhum PEPI apresentado pelo antígeno) e o número máximo de antígenos (todos os antígenos apresentam PEPIs).

[00152] **AP50 - antigenicidade de uma vacina em uma população:** O número médio de antígenos da vacina com um PEPI em uma população. O AP50 é adequado para a caracterização de respostas de células T específicas para os antígenos da vacina em uma dada população, uma vez que depende do genótipo de HLA dos indivíduos em uma população.

[00153] **Contagem de AGP - efetividade de uma vacina em um indivíduo:** Número de antígenos da vacina expressos no tumor com PEPI. A contagem de AGP indica o número de antígenos

tumorais que a vacina reconhece e contra os quais induz uma resposta de células T (atingindo o alvo). A contagem de AGP depende da taxa de expressão de antígenos da vacina no tumor do indivíduo e no genótipo de HLA do indivíduo. O valor correto está entre 0 (nenhum PEPI apresentado pelo antígeno expresso) e o número máximo de antígenos (todos os antígenos são expressos e apresentam um PEPI).

[00154] **AGP50 - efetividade de uma vacina contra câncer em uma população:** O número médio de antígenos da vacina expresso no tumor indicado com PEPI (isto é, AGP) em uma população. O AGP50 indica o número médio de antígenos tumorais que as respostas de células T induzidas pela vacina podem reconhecer. O AGP50 depende da taxa de expressão dos antígenos no tipo de tumor indicado e da imunogenicidade dos antígenos na população-alvo. O AGP50 pode estimar a efetividade de uma vacina em diferentes populações e pode ser usado para comparar diferentes vacinas na mesma população. O cálculo do AGP50 é similar ao usado para o AG50, à exceção de que a expressão é ponderada pela ocorrência de PEPI3+ no indivíduo nos antígenos expressos da vacina. Em uma população teórica, na qual cada indivíduo tem um PEPI de cada antígeno da vacina, o AGP50 será igual a AG50. Em uma outra população teórica, na qual nenhum indivíduo tem um PEPI de qualquer antígeno da vacina, o AGP50 será 0. Em

geral, é válida a seguinte declaração:  $0 \leq \text{AGP50} \leq \text{AG50}$ .

[00155] **mAGP – um biomarcador candidato para a seleção de prováveis respondedores:** Probabilidade de uma vacina contra câncer induzir respostas de células T contra múltiplos antígenos expressos no tumor indicado. O mAGP é calculado a partir das taxas de expressão de antígenos da vacina, por exemplo no tumor, e a presença de PEPIs derivados da vacina no indivíduo. Tecnicamente, com base na distribuição de AGP, o mAGP é a soma das probabilidades de múltiplos AGP ( $\geq 2$  AGPs).

[00156] Os resultados de uma predição, conforme estabelecido acima, podem ser usados para orientar as decisões de um médico sobre o tratamento do indivíduo. Consequentemente, em alguns casos, o método da divulgação prediz que um indivíduo terá ou que é provável que tenha uma resposta de células T e/ou uma resposta clínica a um tratamento, conforme aqui descrito, e o método compreende adicionalmente selecionar o tratamento para o indivíduo humano. Em alguns casos, um indivíduo é selecionado para tratamento se a probabilidade de uma resposta direcionada a um número predefinido de antígenos polipeptídicos-alvo, opcionalmente em que (se prediz que) os antígenos polipeptídicos-alvo são (sejam) expressos, estiver acima de um limite predeterminado. Em alguns casos, o número de antígenos ou epítomos polipeptídicos-alvo é dois. Em alguns

casos, o número de antígenos ou epítomos polipeptídicos-alvo é três, ou quatro, ou cinco, ou seis, ou sete, ou oito, ou nove, ou dez. O método pode adicionalmente compreender administrar o tratamento ao indivíduo humano. Alternativamente, o método pode predizer que o indivíduo não terá uma resposta imune e/ou uma resposta clínica e compreenderá adicionalmente selecionar um tratamento diferente para o indivíduo.

[00157]     Modalidades adicionais da divulgação - (1)

1. Uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 112 a 142.

2. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, ou 6 ou mais peptídeos.

3. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo dois peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 121 e 124.

4. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo quatro peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 126, 130, 131, e 134.

5. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo

seis peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 121, 124, 126, 130, 131, e 134.

6. A composição farmacêutica do item 5, compreendendo adicionalmente pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, MAGE-A8, e MAGE-A6.

7. A composição farmacêutica do item 5, compreendendo adicionalmente um ou mais peptídeos adicionais, cada um do um ou mais peptídeos adicionais compreendendo um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 112-120, 122, 123, 125, 127-129, 132, 133, e 135-142.

8. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

9. A composição farmacêutica do item 8, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinosina, dinitroclorobenzeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos,

emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

10. Uma composição farmacêutica compreendendo uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificando um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOS: 112 a 142.

11. Um método para identificar e tratar um indivíduo humano tendo câncer que provavelmente terá uma resposta clínica à administração de uma composição farmacêutica de acordo com o item 1, compreendendo o método

(i) ensaiar uma amostra biológica do indivíduo para determinar o genótipo de HLA do indivíduo;

(ii) determinar que a composição farmacêutica compreende duas ou mais sequências que são um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo;

(iii) determinar a probabilidade de um tumor do indivíduo expressar um ou mais antígeno correspondente aos epítipos de células T identificados na etapa (ii) usando-se dados de expressão populacional para cada antígeno, para identificar a probabilidade de o indivíduo ter uma resposta clínica à administração da composição farmacêutica. e



(iv) administrar a composição do item 1 ao indivíduo identificado.

12. O método do item 11, em que o indivíduo tem câncer colorretal.

13. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, ou 6 ou mais peptídeos.

14. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende dois peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 121 e 124.

15. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende quatro peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 126, 130, 131, e 134.

16. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende seis peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 121, 124, 126, 130, 131, e 134.

17. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVINA, MAGE-A8, e MAGE-

A6.

18. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente um ou mais peptídeos adicionais, cada um do um ou mais peptídeos adicionais compreendendo um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 112-120, 122, 123, 125, 127-129, 132, 133, e 135-142.

19. O método do item 11, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

20. O método do item 19, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinosina, dinitroclorobenzeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

21. O método do item 11, compreendendo adicionalmente administrar um agente quimioterápico, um inibidor de ponto de verificação, uma terapia direcionada, radioterapia, uma outra

imunoterapia, ou combinação dos mesmos ao indivíduo identificado.

22. O método do item 13, compreendendo adicionalmente antes da etapa de administração,

(i) ensaiar uma amostra de tumor do indivíduo para determinar que os três ou mais peptídeos da composição farmacêutica compreendem duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é

a. um fragmento de um antígeno associado a câncer expresso por células cancerígenas do indivíduo, conforme determinado na etapa (i); e

b. um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo; e

(ii) confirmar o indivíduo como tendo probabilidade de ter uma resposta clínica ao método de tratamento.

[00158] Modalidades adicionais da divulgação - (2)

[00159] Câncer de mama

1. Uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 81 a 111 e 435 a 449.

2. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo 2

ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, 6 ou mais peptídeos, 7 ou mais peptídeos, 8 ou mais peptídeos, 9 ou mais peptídeos, 10 ou mais peptídeos, 11 ou mais peptídeos, ou 12 ou mais peptídeos.

3. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo 9 peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 93, 98, 99-101, e 103-105.

4. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo adicionalmente pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre PIWIL-2, AKAP-4, EpCAM, BORIS, HIWI, SPAG9, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, PRAME, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, HOM-TES-85 e NY-ESO-1.

5. A composição farmacêutica do item 4, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194.

6. A composição farmacêutica do item 4, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 41-60 e 195-233.

7. A composição farmacêutica do item 1, compreendendo

adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

8. A composição farmacêutica do item 7, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinosina, dinitroclorobenzeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

9. Uma composição farmacêutica compreendendo uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificando um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 81 a 111 e 435 a 449.

10. A composição farmacêutica do item 9, em que a uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificam 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, 6 ou mais peptídeos, 7 ou mais peptídeos, 8 ou mais peptídeos, 9 ou mais peptídeos, 10 ou mais peptídeos, 11 ou mais peptídeos, ou 12 ou mais peptídeos.

11. A composição farmacêutica do item 9, em que a uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificam 9 peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 93, 98, 99-101, e 103-105.

12. A composição farmacêutica do item 9, em que a uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificam pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre PIWIL-2, AKAP-4, EpCAM, BORIS, HIWI, SPAG9, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, PRAME, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, HOM-TES-85 e NY-ESO-1.

13. A composição farmacêutica do item 12, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194.

14. A composição farmacêutica do item 12, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 41-60 e 195-233.

15. A composição farmacêutica do item 9, compreendendo adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

16. A composição farmacêutica do item 15, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-

51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprínisona, dinitroclorobenezeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

17. Um método para identificar e tratar um indivíduo humano tendo câncer que provavelmente terá uma resposta clínica à administração de uma composição farmacêutica de acordo com o item 1, compreendendo o método

(i) ensaiar uma amostra biológica do indivíduo para determinar o genótipo de HLA do indivíduo;

(ii) determinar que a composição farmacêutica compreende duas ou mais sequências que são um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo;

(iii) determinar a probabilidade de um tumor do indivíduo expressar um ou mais antígeno correspondente aos epítopos de células T identificados na etapa (ii) usando-se dados de expressão populacional para cada antígeno, para identificar a probabilidade de o indivíduo ter uma resposta clínica à

administração da composição farmacêutica. e

(iv) administrar a composição do item 1 ao indivíduo identificado.

18. O método do item 17, em que o indivíduo tem câncer de mama.

19. O método do item 17, em que a composição compreende 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, 6 ou mais peptídeos, 7 ou mais peptídeos, 8 ou mais peptídeos, 9 ou mais peptídeos, 10 ou mais peptídeos, 11 ou mais peptídeos, ou 12 ou mais peptídeos.

20. O método do item 17, em que a composição farmacêutica compreende 9 peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 92, 93, 98, 99-101, e 103-105.

21. O método do item 17, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre PIWIL-2, AKAP-4, EpCAM, BORIS, HIWI, SPAG9, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, PRAME, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, SURVIVINA, MAGE-A11, HOM-TES-85 e NY-ESO-1.

22. O método do item 21, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194.



23. O método do item 21, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOS: 41-60 e 195-233.

24. O método do item 17, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

25. O método do item 24, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinosina, dinitroclorobenzeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

26. O método do item 17, compreendendo adicionalmente administrar um agente quimioterápico, um inibidor de ponto de verificação, uma terapia direcionada, radioterapia, uma outra imunoterapia, ou combinação dos mesmos ao indivíduo identificado.

27. O método do item 17, compreendendo adicionalmente

antes da etapa de administração,

(iii) ensaiar uma amostra de tumor do indivíduo para determinar que os três ou mais peptídeos da composição farmacêutica compreendem duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é

a. um fragmento de um antígeno associado a câncer expresso por células cancerígenas do indivíduo, conforme determinado na etapa (i); e

b. um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo; e

(iv) confirmar o indivíduo como tendo probabilidade de ter uma resposta clínica ao método de tratamento.

28. Um método para identificar e tratar um indivíduo humano tendo câncer que provavelmente terá uma resposta imune à administração de uma composição farmacêutica de acordo com o item 1, compreendendo o método

(i) ensaiar uma amostra biológica do indivíduo para determinar o genótipo de HLA do indivíduo;

(ii) determinar que a composição farmacêutica compreende duas ou mais sequências que são um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo; e

(iv) administrar a composição do item 1 ao indivíduo identificado.

29. Um kit compreendendo:

a. uma primeira composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 81-111 e 435 a 449; e

b. Uma segunda composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 81-111 e 435 a 449.

30. Uma composição farmacêutica compreendendo: uma molécula de ácido nucleico expressando dois ou mais polipeptídeos, cada polipeptídeo compreendendo um fragmento de até 50 aminoácidos consecutivos de um antígeno selecionado dentre PIWIL-2, AKAP-4, EpCAM, BORIS, HIWI, SPAG9, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, PRAME, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, SURVIVIN, MAGE-A11, HOM-TES-85 e NY-ESO-1, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24, e 172 a 194.

31. Uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da

sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 332-346.

32. A composição farmacêutica do item 31, compreendendo 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, 6 ou mais peptídeos, 7 ou mais peptídeos, 8 ou mais peptídeos, 9 ou mais peptídeos, 10 ou mais peptídeos, 11 ou mais peptídeos, 12 ou mais peptídeos, 13 ou mais peptídeos, 14 ou mais peptídeos, ou 15 ou mais peptídeos.

33. A composição farmacêutica do item 31, compreendendo 15 peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 332-346.

34. A composição farmacêutica do item 31, compreendendo adicionalmente pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA, e AKAP-3.

35. A composição farmacêutica do item 34, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272-301.

36. A composição farmacêutica do item 34, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID

NOs: e 302-331.

37. A composição farmacêutica do item 31, compreendendo adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

38. A composição farmacêutica do item 37, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprínisona, dinitroclorobenzeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

39. Uma composição farmacêutica compreendendo uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificando um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 332-346.

40. A composição farmacêutica do item 39, em que a uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificam 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, 6 ou mais peptídeos, 7 ou mais peptídeos, 8 ou mais peptídeos, 9 ou mais peptídeos, 10 ou mais peptídeos, 11 ou mais peptídeos,

12 ou mais peptídeos, 13 ou mais peptídeos, 14 ou mais peptídeos, ou 15 ou mais peptídeos.

41. A composição farmacêutica do item 39, em que a uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificam 15 peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 332-346.

42. A composição farmacêutica do item 39, em que a uma ou mais moléculas de ácido nucleico codificam pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragmento de um antígeno selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA, e AKAP-3.

43. A composição farmacêutica do item 42, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272-301.

44. A composição farmacêutica do item 42, em que o fragmento de um antígeno compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: e 302-331.

45. A composição farmacêutica do item 39, compreendendo adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

46. A composição farmacêutica do item 45, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynbacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinisona, dinitroclorobenezeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

47. Um método para identificar e tratar um indivíduo humano tendo câncer que provavelmente terá uma resposta clínica à administração de uma composição farmacêutica de acordo com o item 28, compreendendo o método

(i) ensaiar uma amostra biológica do indivíduo para determinar o genótipo de HLA do indivíduo;

(ii) determinar que a composição farmacêutica compreende duas ou mais sequências que são um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo;

(iii) determinar a probabilidade de um tumor do indivíduo expressar um ou mais antígeno correspondente aos epítipos de células T identificados na etapa (ii) usando-se dados de

expressão populacional para cada antígeno, para identificar a probabilidade de o indivíduo ter uma resposta clínica à administração da composição farmacêutica.

(iv) administrar a composição do item 28 ao indivíduo identificado.

48. O método do item 47, em que o indivíduo tem câncer de ovário.

49. O método do item 47, em que a composição farmacêutica compreende 2 ou mais peptídeos, 3 ou mais peptídeos, 4 ou mais peptídeos, 5 ou mais peptídeos, 6 ou mais peptídeos, 7 ou mais peptídeos, 8 ou mais peptídeos, 9 ou mais peptídeos, 10 ou mais peptídeos, 11 ou mais peptídeos, 12 ou mais peptídeos, 13 ou mais peptídeos, 14 ou mais peptídeos, ou 15 ou mais peptídeos.

50. O método do item 47, em que a composição farmacêutica compreende 15 peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 332-346.

51. O método do item 47, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente pelo menos um peptídeo adicional compreendendo um fragPIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OYTES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA, e AKAP-3.

52. O método do item 51, em que o fragmento compreende



uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272-301.

53. O método do item 51, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 302-331.

54. O método do item 47, em que a composição farmacêutica compreende adicionalmente um adjuvante, diluente, veículo, conservante farmacêuticamente aceitáveis, ou combinação dos mesmos.

55. O método do item 54, em que o adjuvante é selecionado do grupo consistindo em Montanide ISA-51, QS-21, GM-CSF, ciclofosamida, bacilo Calmette-Guerin (BCG), corynebacterium parvum, levamisol, azimezona, isoprinosina, dinitroclorobenzeno (DNCB), hemocianinas de lapa (KLH), adjuvante de Freund (completo), adjuvante de Freund (incompleto), géis de minerais, hidróxido de alumínio (Alúmen), lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, dinitrofenol, toxina da difteria (DT), e uma combinações dos mesmos.

56. O método do item 47, compreendendo adicionalmente administrar um agente quimioterápico, um inibidor de ponto de verificação, uma terapia direcionada, radioterapia, uma outra imunoterapia, ou combinação dos mesmos ao indivíduo

identificado.

57. O método do item 47, compreendendo adicionalmente antes da etapa de administração,

ensaiar uma amostra de tumor do indivíduo para determinar que os três ou mais peptídeos da composição farmacêutica compreendem duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é

a. um fragmento de um antígeno associado a câncer expresso por células cancerígenas do indivíduo, conforme determinado na etapa (i); e

b. um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo; e

confirmar o indivíduo como tendo probabilidade de ter uma resposta clínica ao método de tratamento.

58. Um método para identificar e tratar um indivíduo humano tendo câncer que provavelmente terá uma resposta imune à administração de uma composição farmacêutica de acordo com o item 31, compreendendo o método

(i) ensaiar uma amostra biológica do indivíduo para determinar o genótipo de HLA do indivíduo;

(ii) determinar que a composição farmacêutica compreende duas ou mais sequências que são um epítipo de células T que

tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA de classe I do indivíduo; e

(iii) administrar a composição do item 31 ao indivíduo identificado.

59. Um kit compreendendo:

a. uma primeira composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 332-346; e

b. uma segunda composição farmacêutica compreendendo um ou mais peptídeos, em que cada peptídeo compreende um diferente da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 332-346.

60. Uma composição farmacêutica compreendendo: uma molécula de ácido nucleico expressando dois ou mais polipeptídeos, cada polipeptídeo compreendendo um fragmento de até 50 aminoácidos consecutivos de um antígeno selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVINA, e AKAP-3, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272-301.

[00160] Exemplos

[00161] Exemplo 1 - Processo e validação de predição de ligação a epítomos de HLA

[00162] A ligação predita entre um HLA em particular e epítomos (peptídeos 9-méricos) baseou-se na ferramenta Immune Epitope Database para predição de epítomos ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)).

[00163] O processo de predição de ligação a epítomos de HLA I foi validado por comparação com pares HLA I-epítomo determinados por experimentos de laboratório. Foi compilado um conjunto de dados de pares HLA I-epítomo relatados em publicações revisadas por pares ou em bases de dados imunológicos públicas.

[00164] A taxa de concordância com o conjunto de dados determinado experimentalmente (Tabela 2) foi determinada. Os pares de ligação HLA-epítomo do conjunto de dados foram preditos corretamente com uma probabilidade de 93%. Coincidentemente, os pares HLA I-epítomo que não se ligam também foram preditos corretamente com uma probabilidade de 93%.

Tabela 2. Especificidade e sensibilidade analíticas do processo de predição de ligação HLA-epítomos.

<i>Pares HLA-epítomo</i>	<i>Epítomos</i>	<i>Epítomos falsos</i>
	<i>verdadeiros (n=327)</i>	<i>(n=100)</i>

	<i>(Correspondência de ligantes)</i>	<i>(Correspondência de não ligantes)</i>
<i>HIV</i>	91% (32)	82% (14)
<i>Viral</i>	100% (35)	100% (11)
<i>Tumor</i>	90% (172)	94% (32)
<i>Outros (fungos, bactérias etc.)</i>	100% (65)	95% (36)
<i>Todos</i>	93% (304)	93% (93)

[00165] Foi determinada a acurácia da predição de epítomos que se ligam a múltiplos HLA. Com base na especificidade e na sensibilidade analíticas e usando-se a probabilidade de 93% para a predição tanto de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos e a probabilidade de 7% (= 100% - 93%) para a predição de falsos positivos e falsos negativos, pode ser calculada a probabilidade da existência de um epítomo que se liga a múltiplos HLA em uma pessoa. A probabilidade de ligação múltipla de HLA a um epítomo mostra a relação entre o número de HLAs que se ligam a um epítomo e o número mínimo esperado de ligações reais. Pela definição de PEPI, três é o número mínimo esperado de HLA que se liguem a um epítomo (negrito).

Tabela 3. Acurácia de predições de múltiplos HLA que se ligam a epítomos.

Número mínimo esperado de ligações reais de HLA	Número predito de HLAs que se ligam a um epítopo						
	0	1	2	3	4	5	6
1	35%	95%	100%	100%	100%	100%	100%
2	6%	29%	90%	99%	100%	100%	100%
3	1%	4%	22%	84%	98%	100%	100%
4	0%	0%	2%	16%	78%	96%	99%
5	0%	0%	0%	1%	10%	71%	94%
6	0%	0%	0%	0%	0%	5%	65%

[00166] O processo de predição de ligação HLA-epítopo validado foi usado para se determinarem todos os pares de ligação HLA-epítopo descritos nos Exemplos abaixo.

[00167] Exemplo 2 - A apresentação de epítomos por múltiplos HLA prediz a resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL)

[00168] A apresentação de um ou mais epítomos de um antígeno polipeptídico por um ou mais HLA I de um indivíduo é preditiva de uma resposta de CTL foi determinada.

[00169] O estudo foi realizado por análise retrospectiva de seis ensaios clínicos, realizados em 71 pacientes com câncer e 9 pacientes infectados pelo HIV (Tabela 11)<sup>1-7</sup>. Os pacientes desses estudos foram tratados com uma vacina contra o HPV, três diferentes vacinas NY-ESO-1 específicas contra câncer, uma vacina contra HIV-1 e um anticorpo monoclonal específico para CTLA-4 (Ipilimumab) que demonstrou reativar CTLs contra o antígeno NY-ESO-1 em pacientes com melanoma. Todos estes ensaios clínicos mediram

respostas de CTL CD8+-específicas para antígenos (imunogenicidade) nos indivíduos do estudo após a vacinação. Em alguns casos, foram relatadas correlações entre respostas de CTL e respostas clínicas.

[00170] Nenhum paciente foi excluído do estudo retroativo por qualquer outro motivo que não a disponibilidade de dados. Os 157 conjuntos de dados de pacientes (Tabela 4) foram aleatorizados com um gerador de números aleatórios padrão para criar duas coortes independentes para estudos de treinamento e de avaliação. Em alguns casos, as coortes continham vários conjuntos de dados do mesmo paciente, resultando em uma coorte de treinamento com 76 conjuntos de dados de 48 pacientes e uma coorte de teste/validação com 81 conjuntos de dados de 51 pacientes.

Tabela 4. Resumo dos conjuntos de dados dos pacientes

Ensaio clínico	Imunoterapia	Antígeno-Alvo	Doença	Nº Pacientes*	Nº Conjuntos de dados (Nº do antígeno x Nº do paciente)	Imunoensaio realizado nos ensaios clínicos*	Método de genotipagem de HLA	Ref.
1	VGX-3100	HPV16-E6 HPV16-E7 HPV18-E6 HPV18-E7 HPV16/18	Câncer cervical	17/18	5 x 17	IFN-γ ELISPOT	SBT de alta resolução	1
2	Vacina HIVIS	HIV-1 Gag HIV-1	AIDS	9/12	2 x 9	IFN-γ ELISPOT	SSO de Baixa-Média Resolução	2

		RT						
3	rNY-ESO-1	NY-ESO-1	Cânceres de mama e de ovário, melanoma e sarcoma	18/18	1 x 18	IFN- $\gamma$ ELISPOT <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	SBT de alta resolução	34
4	Ipilimumab	NY-ESO-1	Melanoma metastático	19/20	1 x 19	ICS após estimulação de células T	Tipagem de baixa a média resolução, SSP de DNA genômico, sequenciamento de alta resolução	5
5	NY-ESO-1f	NY-ESO-1 (91-110)	Câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer gástrico	10/10	1 x 10	ICS após estimulação de células T	Sondagem SSO e SSP de DNA genômico	6
6	Peptídeos sobrepostos NY-ESO-1	NY-ESO-1 (79-173)	Cânceres de esôfago e de pulmão, melanoma maligno	7/9	1 x 7	ICS após estimulação de células T	Sondagem SSO e SSP de DNA genômico	7
Total	6	7		80	157	N/D		
<p>*Número de pacientes usados na análise retrospectiva a partir do número original de pacientes dos ensaios clínicos.</p> <p>**Os imunoenaios são baseados na estimulação de células T com “pools” de peptídeos específicos para antígenos e quantificam as citocinas liberadas por diferentes técnicas.</p> <p>CT: Ensaio clínico; SBT: Tipagem Baseada em Sequência; SSO: Oligonucleotídeo específico de sequência; ICS: Coloração intracelular de citocinas (do inglês “Intracellular cytokine staining”); SSP: Iniciação (“priming”) específica de sequência</p>								

[00171] As respostas de CTL relatadas do conjunto de dados de treinamento foram comparadas com o perfil de restrição de HLA I de epítomos (9-méricos) dos antígenos da vacina. As sequências dos antígenos e o genótipo de HLA I de cada paciente foram obtidos a partir de bases de dados de sequências de proteínas disponíveis ao público ou de publicações revisadas por pares e o processo de predição de ligação HLA I-epítopo era cego para os dados clínicos de resposta de CTL dos



pacientes. O número de epítomos de cada antígeno predito que se ligue a pelo menos 1 (PEPI1+), ou a pelo menos 2 (PEPI2+), ou a pelo menos 3 (PEPI3+), ou a pelo menos 4 (PEPI4+), ou a pelo menos 4 (PEPI4+) ou a pelo menos 5 (PEPI5+), ou a todas as 6 (PEPI6) moléculas de HLA de classe I de cada paciente foi determinado e o número de HLA ligados foram usados como classificadores para as respostas de CTL relatadas. A taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) e a taxa de verdadeiros negativos (especificidade) foram determinadas a partir do conjunto de dados de treinamento para cada classificador (número de HLA ligados) separadamente.

[00172] A análise ROC foi realizada para cada classificador. Em uma curva ROC, a taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade) foi plotada em função da taxa de falsos positivos (1-Especificidade) para diferentes pontos de corte (FIG. 1). Cada ponto na curva ROC representa um par de sensibilidade/especificidade correspondente a um limite de decisão em particular (contagem de epítomos (PEPI)). A área sob a curva ROC (ASC) é uma medida de quão bem o classificador pode distinguir entre dois grupos diagnósticos (respondedor ou não respondedor a CTL).

[00173] A análise inesperadamente revelou que a apresentação de epítomos predita por múltiplos HLAs de classe

I de um indivíduo (PEPI2+, PEPI3+, PEPI4+, PEPI5+, ou PEPI6) era, em todos os casos, um melhor preditor da resposta de CTL do que a apresentação de epítomos por meramente um ou mais HLA de classe I (PEPI1+, ASC = 0,48, Tabela 5).

Tabela 5. Determinação do valor diagnóstico do biomarcador PEPI por análise ROC

Classificadores	AUC
PEPI1+	0,48
PEPI2+	0,51
PEPI3+	0,65
PEPI4+	0,52
PEPI5+	0,5
PEPI6+	0,5

[00174] A resposta de CTL de um indivíduo foi melhor predita considerando-se os epítomos de um antígeno que poderiam ser apresentados por pelo menos 3 HLA de classe I de um indivíduo (PEPI3+, ASC = 0,65, Tabela 5). A contagem limite de PEPI3+ (número de epítomos específicos para antígenos apresentados por 3 ou mais HLA de um indivíduo) que melhor predisse uma resposta de CTL positiva foi de 1 (Tabela 6). Em outras palavras, pelo menos um epítomo derivado de antígeno é apresentado por pelo menos 3 HLA de classe I de um indivíduo (PEPI3+  $\geq 1$ ), então o antígeno pode desencadear pelo menos um

clone de CTL e o indivíduo é um provável respondedor a CTL. O uso do limite PEPI3+  $\geq 1$  para prever prováveis respondedores a CTL ("Teste PEPI3+  $\geq 1$ ") resultou em 76% de sensibilidade diagnóstica (Tabela 12).

Tabela 6. Determinação do limite PEPI3+  $\geq 1$  para prever prováveis respondedores a CTL no conjunto de dados de treinamento.

	Contagem de PEPI3+											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sensibilidade:	<b>0,76</b>	0,60	0,31	0,26	0,14	0,02	0	0	0	0	0	0
1-Especificidade:	<b>0,59</b>	0,24	0,21	0,15	0,09	0,06	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

[00175] Exemplo 3 - Validação do teste PEPI3+  $\geq 1$

[00176] A coorte de teste de 81 conjuntos de dados de 51 pacientes foi usada para validar o limite PEPI3+  $\geq 1$  para prever uma resposta de CTL específica para antígenos. Para cada conjunto de dados na coorte de teste, foi determinado se o limite PEPI3+  $\geq 1$  foi atingido (pelo menos um epítipo derivado de antígeno apresentado por pelo menos três HLA de classe I do indivíduo). Isto foi comparado com as respostas de CTL determinadas experimentalmente relatadas nos ensaios clínicos (Tabela 7).

[00177] A validação clínica demonstrou que um peptídeo PEPI3+ induz resposta de CTL em um indivíduo com 84% de probabilidade. 84% é o mesmo valor que foi determinado na validação analítica da predição de PEPI3+, epítipos que se

ligam a pelo menos 3 HLAs de um indivíduo (Tabela 3). Estes dados fornecem fortes evidências de que as respostas imunes são induzidas por PEPIs em indivíduos.

Tabela 7. Características de desempenho diagnóstico do Teste PEPI3+  $\geq 1$  (n=81).

Característica de desempenho	Descrição	Resultados
Valor preditivo positivo (VPP)	100% $[A / (A + B)]$ A probabilidade de um indivíduo que atinge o limite PEPI3+ $\geq 1$ ter respostas de CTL específicas para os antígenos após o tratamento com imunoterapia.	84%
Sensibilidade	100% $[A / (A + C)]$ A proporção de indivíduos com respostas de CTL específicas para os antígenos após tratamento com imunoterapia e que atingem o limite de PEPI3+ $\geq 1$ .	75%
Especificidade	100% $[D / (B + D)]$ A proporção de indivíduos sem respostas de CTL específicas para os antígenos após tratamento com imunoterapia e que não atingem o limite de PEPI3+ $\geq 1$ .	55%
Valor preditivo negativo (VPN)	100% $[D / (C + D)]$ A probabilidade de um indivíduo que não atinge o limite de PEPI3+ $\geq 1$ não ter respostas de CTL específicas para os antígenos após o tratamento com imunoterapia.	42%
Percentual Geral de Concordância (OPA)	100% $[(A + D) / N]$ A porcentagem de predições com base no limite PEPI3+ $\geq 1$ que corresponde ao resultado determinado experimentalmente, quer positivo quer negativo.	70%
Exato de Fisher (p)		0,01

[00178] A análise ROC determinou a acurácia diagnóstica, usando-se a contagem de PEPI3+ como valores de corte (Fig. 2). O valor da ASC = 0,73. Para a análise ROC, uma ASC de 0,7 a 0,8 é geralmente considerada como um bom diagnóstico.

[00179] Uma contagem de PEPI3+ de pelo menos 1 (PEPI3+  $\geq 1$ ) foi a que melhor predisse uma resposta de CTL no conjunto

de dados de teste (Tabela 8). Este resultado confirmou o limite determinado durante o treinamento (Tabela 5).

Tabela 8. Confirmação do limite PEPI3+  $\geq 1$  para predizer prováveis respondedores de CTL no conjunto de dados de teste/de validação.

	Contagem de PEPI3+											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sensibilidade:	<b>0,75</b>	0,52	0,26	0,23	0,15	0,13	0,08	0,05	0	0	0	0
1-Especificidade:	<b>0,45</b>	0,15	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[00180] Exemplo 4 – O Teste PEPI3+  $\geq 1$  prediz as reatividades de CTL CD8+

[00181] O Teste PEPI3+  $\geq 1$  foi comparado com um método relatado anteriormente para predizer a resposta de CTL de um indivíduo humano específico a antígenos peptídicos.

[00182] Os genótipos de HLA de 28 pacientes com câncer cervical e NIV-3 que receberam a vacina sintética de peptídeo longo (LPV) contra HPV-16 em dois ensaios clínicos diferentes foram determinados a partir de amostras de DNA<sup>8 9 10</sup>. A LPV consiste em peptídeos longos abrangendo as oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV-16. A sequência de aminoácidos de LPV foi obtida destas publicações. As publicações também relatam as respostas de células T de cada paciente vacinada a “pools” de peptídeos sobrepostos da vacina.

[00183] Para cada paciente, epítomos (9-méricos) do LPV que são apresentados por HLA classe da I de pelo menos três

pacientes (PEPI3+s) foram identificados e a sua distribuição entre os "pools" de peptídeos foi determinada. Foi predito que os peptídeos que compreendessem pelo menos um PEPI3+ (PEPI3+  $\geq 1$ ) induziriam uma resposta de CTL. Foi predito que os peptídeos que não contivessem PEPI3+ não induziriam uma resposta de CTL.

[00184] O Teste PEPI3+  $\geq 1$  predisse corretamente 489 de 512 respostas negativas de CTL e 8 de 40 respostas positivas de CTL medidas após a vacinação (Fig. 3A). Globalmente, a concordância entre o Teste PEPI3+  $\geq 1$  e a reatividade das células T CD8+ determinada experimentalmente foi de 90% ( $p < 0,001$ ).

[00185] Para cada paciente, também foi determinada a distribuição entre os "pools" de peptídeos de epítomos que são apresentados por pelo menos um HLA de classe I do paciente (PEPI1+  $\geq 1$ , predição de epítomos restritos a HLA, método da técnica anterior). PEPI1+  $\geq 1$  predisse corretamente 116 de 512 respostas negativas de CTL e 37 de 40 respostas positivas de CTL medidas após a vacinação (FIG. 3B). Globalmente, a concordância entre a predição de epítomos restritos a HLA (PEPI1+  $\geq 1$ ) e a reatividade das células T CD8+ foi de 28% (não significativa).

[00186] Exemplo 5 - Predição de epítomos de células T

auxiliares CD4+ restritos a HLA de classe II

[00187] As 28 pacientes com câncer cervical e NIV-3 que receberam a vacina de peptídeo longo sintética contra HPV-16 (LPV) em dois ensaios clínicos diferentes (conforme detalhado no Exemplo 4) foram investigadas quanto às respostas de T auxiliares CD4+ após a vacinação com LPV (FIG. 4). A sensibilidade da predição de epítomos restritos a HLA de classe II foi de 78%, uma vez que a ferramenta de última geração predisse 84 respostas positivas (reatividade positiva de células T CD4+ a um "pool" de peptídeos para alelos de DP de uma pessoa) em 107 (sensibilidade = 78%). A especificidade foi de 22%, uma vez que foram excluídas 7 respostas negativas em 31. No geral, a concordância entre a predição de epítomos restritos a HLA de classe II e a reatividade de células T CD4+ foi de 66%, o que foi estatisticamente não significativo.

[00188] Exemplo 6 - O Teste PEPI3+  $\geq 1$  prediz respostas de células T a polipeptídeos de LPV de comprimento total

[00189] Usando-se os mesmos estudos relatados que os Exemplos 4 e 5, o Teste PEPI3+  $\geq 1$  foi usado para prever as respostas das células T CD8+ e CD4+ de pacientes aos antígenos polipeptídicos E6 e E7 de comprimento total da vacina LPV. Os resultados foram comparados com as respostas determinadas experimentalmente. O Teste predisse corretamente a reatividade

das células T CD8+ (PEPI3+) em 11 das 15 pacientes com NIV e resultados positivos nos testes de reatividade das células T CD8+ (sensibilidade de 73%, VPP de 85%) e em 2 das 5 pacientes com câncer cervical (sensibilidade de 40%, VPP de 100%). As reatividades das células T CD4+ (PEPI4+) foram corretamente preditas em 100% tanto das pacientes com NIV-3 quanto das com câncer cervical (Fig. 5).

[00190] Observou-se também que a contagem de PEPI3+ restrita a HLA das classes I e II estava correlacionada com o benefício clínico relatado para pacientes vacinadas com LPV. Pacientes com contagens mais altas de PEPI3+ tiveram ou uma resposta completa ou uma resposta parcial já após 3 meses.

[00191] Exemplo 7 - Estudo de Caso

[00192] pGX3001 é uma vacina de DNA baseada em HPV16 contendo antígenos E6 e E7 de comprimento total com um ligante ("linker") entre eles. pGX3002 é uma vacina de DNA baseada em HPV18 contendo antígenos E6 e E7 de comprimento total com um ligante ("linker") entre eles. Um ensaio clínico de fase II investigou as respostas das células T de 17 pacientes infectadas por HPV com câncer cervical que foram vacinadas tanto com pGX3001 quanto com pGX3002 (vacinação VGX-3100)<sup>1</sup>.

[00193] As Figs. 5-6 mostram, para duas pacientes a título de ilustração (paciente 12-11 e paciente 14-5), a



posição de cada epítopo (9-mérico) apresentado por pelo menos 1 (PEPI1+), pelo menos 2 (PEPI2+), pelo menos 3 (PEPI3+), pelo menos 4 (PEPI4+), pelo menos 5 (PEPI5+) ou todos os 6 (PEPI6) HLA de classe I destas pacientes dentro da sequência de comprimento total dos dois antígenos de HPV-16 e dos dois de HPV-18.

[00194] A paciente 12-11 teve uma contagem global de 54 PEPI1+ para as vacinas combinadas (54 epítomos apresentados por um ou mais HLA de classe I). A paciente 14-5 teve uma contagem de PEPI1+ de 91. Portanto, a paciente 14-5 tem uma contagem de PEPI1+ mais alta do que a paciente 12-11 em relação aos quatro antígenos de HPV. Os PEPI1+s representam os conjuntos distintos de epítomos restritos a HLA específicos para antígenos de vacina das pacientes 12-11 e 14-5. Apenas 27 PEPI1+s foram comuns entre estas duas pacientes.

[00195] Para as contagens de PEPI3+ (número de epítomos apresentados por três ou mais HLA de classe I de pacientes), os resultados para as pacientes 12-11 e 14-5 estavam invertidos. A paciente 12-11 teve uma contagem de PEPI3+ de 8, incluindo pelo menos um PEPI3+ em cada um dos quatro antígenos de HPV16/18. A paciente 14-5 teve uma contagem de PEPI3+ de 0.

[00196] As respostas imunes relatadas destas duas pacientes corresponderam às contagens de PEPI3+, não às

contagens de PEPI1+. A paciente 12-11 desenvolveu respostas imunes a cada um dos quatro antígenos pós-vacinação, conforme medido por ELISpot, enquanto a paciente 14-5 não desenvolveu respostas imunes a nenhum dos quatro antígenos das vacinas. Um padrão similar foi observado quando foram comparados os conjuntos de PEPI1+ e de PEPI3+ de todas as 17 pacientes no ensaio. Não houve correlação entre a contagem de PEPI1+ e as respostas de células T determinadas experimentalmente relatadas a partir do ensaio clínico. No entanto, foi observada correlação entre a imunidade de células T predita pelo Teste PEPI3+  $\geq 1$  e a imunidade de células T relatada. O Teste PEPI3+  $\geq 1$  predisse as respondedoras imunes após vacina de DNA contra o HPV.

[00197] Além disso, a diversidade do conjunto de PEPI3+ da paciente assemelhava-se à diversidade de respostas de células T geralmente encontradas em ensaios de vacinas contra câncer. As pacientes 12-3 e 12-6, de modo similar à paciente 14-5, não tinham PEPI3+s que predissessem que a vacina contra o HPV poderia não desencadear imunidade das células T. Todas as outras pacientes tinham pelo menos um PEPI3 predizendo a probabilidade de a vacina contra o HPV poder desencadear imunidade das células T. 11 pacientes tinham múltiplos PEPI3+, predizendo que a vacina contra HPV provavelmente desencadeia

respostas policlonais de células T. As pacientes 15-2 e 15-3 puderam montar uma imunidade de células T de alta magnitude a E6 de ambos os HPV, mas uma baixa imunidade a E7. Outras pacientes, 15-1 e 12-11, tiveram a mesma resposta de magnitude a E7 de HPV18 e de HPV16, respectivamente.

[00198] Exemplo 8 - Desenho de uma População Modelo para conduzir ensaios clínicos *in silico* e identificar alvos vacinais de precisão candidatos para uma grande população

[00199] Uma coorte *in silico* de um ensaio com 433 indivíduos com genótipo completo de HLA de classe I de 4 dígitos (2 x HLA-A\*xx:xx; 2 x HLA-B\*xx:xx; 2 x HLA-C\*xx:xx) e informações demográficas foram compiladas. Esta População Modelo tem indivíduos com etnia mista, tendo um total de 152 alelos de HLA diferentes que são representativos de > 85% dos grupos G de alelos atualmente conhecidos.

[00200] Também foi estabelecida uma base de dados de uma "Grande População" contendo 7.189 indivíduos caracterizados com genótipo de HLA de quatro dígitos e informações demográficas. A Grande População tem 328 alelos de HLA de classe I diferentes. A distribuição de alelos de HLA da População Modelo correlacionou-se significativamente com a Grande População (Tabela 16) (Pearson  $p < 0,001$ ). Portanto, a População Modelo de 433 pacientes é representativa para uma

população 16 vezes maior.

[00201] A População Modelo é representativa para 85% da raça humana, pela diversidade de HLA, assim como pela frequência de HLA.

Tabela 9. Análise estatística das distribuições de HLA na "População Modelo" versus na "Grande População".

Nome do grupo 1	Nome do grupo 2	Valor R de Pearson	Correlação	Valor-P
População Modelo de 433	Grande População de 7.189	0,89	Forte	P<0,001

[00202] Exemplo 9 - Ensaios clínicos *in silico* baseados na identificação de múltiplos epítomos que se ligam a HLA predizem as taxas de resposta de células T relatadas em ensaios clínicos

[00203] O objetivo deste estudo foi determinar se uma população modelo, tal como a descrita no Exemplo 8, poderia ser usada para prever as taxas de reatividade de CTL de vacinas, isto é, se poderia ser usada em ensaios de eficácia *in silico*.

[00204] Doze vacinas de peptídeos derivadas de antígenos de câncer que induziram respostas de células T em uma subpopulação de indivíduos foram identificadas em publicações revisadas por pares. Estes peptídeos foram investigados em ensaios clínicos envolvendo um total de 172 pacientes (4 etnias). As respostas de células T induzidas pelos

peptídeos da vacina foram determinadas a partir de amostras de sangue e relatadas. Foi determinada a taxa de resposta imune como a porcentagem de indivíduos do estudo com respostas positivas de células T medidas nos ensaios clínicos (FIG. 7).

Tabela 10. Ensaios clínicos realizados com vacinas de peptídeos.

<i>Vacinas de peptídeos</i>	<i>Antígeno de origem</i>	<i>Comprimento do peptídeo</i>	<i>Ensaio de células T</i>	<i>de</i>	<i>Pop. (n)</i>	<i>Etnia</i>	<i>Ref.</i>
MMNLMQPKTQQTYTYD	JUP	16-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
GRGSTTNYLLDRDDYRNTSD	ADA17	21-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
LKKGAADGGKLDGNAKLNRSK	BAP31	22-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
FFPKDDHTLKFYDDNQRPYPP	TOP2A	22-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
RYRKPDYTLDDGHGLLRFKST	Abl-2	21-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
QRPPFSQLHRFLDALNT	DDR1	18-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
ALDQCKTSCALMQQHYDQTSCFSSP	ITGB8	25-mérico	Coloração multimer	de	18	canadense	<sup>12</sup>
STAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTAPP	MUC-1	25-mérico	Proliferação		80	canadense	<sup>13</sup>
YLEPGPVTA	gp100	9-mérico	Tetramérico		18	EUA	<sup>14</sup>
MTFGTQSPFFLLLLLVLTIV	MUC-1	21-mérico	Citotoxicidade		10	israelense	<sup>15</sup>
SSKALQRPV	Bcr-Abl	9-mérico	ELISPOT		4	EUA	<sup>16</sup>
RMFPNAPYL	WT-1	9-mérico	Coloração multimer	de	24	EUA	<sup>17</sup>
RMFPNAPYL (HLA-A*0201)	WT-1	9-mérico	Coloração de citocinas	de	18	CEU	<sup>18</sup>

[00205] Os 12 peptídeos foram investigados com o Teste PEPI3+  $\geq 1$  em cada um dos 433 indivíduos da População Modelo descrita no Exemplo 8. O "Escore de PEPI3+  $\geq 1$ " para cada peptídeo foi calculado como a proporção de indivíduos na População Modelo tendo pelo menos um epítipo derivado de vacina que poderia se ligar a pelo menos três HLA de classe I específicos para o indivíduo (PEPI3+  $\geq 1$ ). Se o ensaio clínico

correspondente estratificava pacientes pela população de alelos de HLA, a População Modelo também era filtrada para indivíduos com o(s) respectivo(s) alelo(s) (Exemplo: WT1, HLA-A\*0201).

[00206] As taxas de resposta determinadas experimentalmente relatadas a partir dos ensaios foram comparadas com os Escores de PEPI3+  $\geq 1$ . O Percentual Geral de Concordância (OPA) foi calculado com base nos dados pareados (Tabela 11). Foi observada uma correlação linear entre Escore de PEPI3+  $\geq 1$  e taxa de resposta ( $R^2 = 0,77$ ) (FIG. 7). Este resultado mostra que a identificação de peptídeos que se prediz que se liguem a múltiplos HLAs de um indivíduo é útil para predizer, *in silico*, o resultado de ensaios clínicos.

Tabela 11. Comparação de Escores de PEPI3+  $\geq 1$  e taxas de resposta de CTL de 12 vacinas de peptídeos.

Vacina de peptídeo	Antígeno de origem	Taxa de resposta (Ensaio clínico)	Escore de PEPI3+ $\geq 1$ * (População Modelo)	OPA
MMNLMQPKTQQTYYTD	JUP	0%	22%	NA
GRGSTTTNYLLDRDDYRNTSD	ADA17	11%	18%	61%
LKKGAADGGKLDGNAKLNRSIK	BAP31	11%	7%	64%
FPFKDDHTLKFLYDDNQRPYFP	TOP2A	11%	39%	28%
RYRKPDYTLDDGHGLLRFKST	Abl-2	17%	12%	71%
QRPFPSQLHRFLADALNT	DDR1	17%	5%	29%
ALDQCKTSCALMQQHYDQTSCFSSP	ITGB8	28%	31%	90%

STAPPAHGVTSA PDTRPAGSTAPP	MUC-1	20%	2%	10%
YLEPGPVTA	gp100	28%	4%	14%
MTPGTQSPFFLLLLLT VLT VV	MUC-1	90%	95%	95%
SSKALQRPV	Bcr-Abl	0%	0%	100%
RMFFNAPYL	WT-1	100%	78%	78%
RMFFNAPYL (HLA-A*0201)	WT-1	81%	61%	75%
*% de indivíduos na População Modelo com PEPI3+ derivado de vacina $\geq 1$				

[00207] Exemplo 10. Exemplo 10 - Ensaios clínicos *in silico* baseados na identificação epítomos que se ligam a múltiplos HLA predizem as taxas de resposta de células T relatadas nos ensaios clínicos II

[00208] Foram identificados dezenove ensaios clínicos com taxas de resposta imune (TRI) publicadas realizados com peptídeos ou vacinas baseadas em DNA (Tabela 19). Estes ensaios envolveram 604 pacientes (9 etnias) e abrangeram 38 vacinas derivadas de antígenos tumorais e virais. As respostas de CTL específicas para os antígenos das vacinas foram medidas em cada paciente do estudo e a taxa de resposta nas populações do estudo clínico foi calculada e relatada.

[00209] Cada peptídeo das vacinas dos 19 ensaios clínicos foi investigado com o Teste PEPI3+  $\geq 1$  em cada indivíduo da População Modelo. O Escore de PEPI3+  $\geq 1$  para cada peptídeo foi calculado como a proporção de indivíduos na População Modelo tendo pelo menos um PEPI3+ derivado da vacina. As taxas de resposta determinadas experimentalmente relatadas

nos ensaios foram comparadas com os Escores de PEPI, como no Exemplo 9 (Tabela 20). Foi observada uma correlação linear entre a taxa de resposta e Escore de PEPI3+  $\geq 1$  ( $R^2 = 0,70$ ) (FIG. 8). Este resultado confirma que a identificação de peptídeos preditos que se liguem a múltiplos HLA de um indivíduo pode prever respostas de células T de indivíduos e, em ensaios *in silico*, pode prever o resultado de ensaios clínicos.

Tabela 12. Taxas de resposta publicadas em ensaios clínicos.					
Imunoterapia	Tipo	Ensaio de CTL	Pop. (n)	Raça/Etnia	Ref.
StimuVax	peptídeo	Proliferação	80	canadense	13
vacina gp100	DNA	Tetramérico	18	EUA	14
IMA901 fase I	peptídeo	ELISPOT	64	CEU	19
IMA901 fase II	peptídeo	Coloração de multímero	27	CEU	
ICT107	peptídeo	ICC	15	EUA	20
ProstVac	DNA	ELISPOT	32	CEU 87%, Afr. Am. 12%, Hisp. 1%	21
Synchrotope TA2M	DNA	Tetramérico	26	EUA	22
MELITAC 12.1	peptídeo	ELISPOT	167	EUA	23



	o				
vacina WT1	peptídeo	Tetramérico	22	japonesa	24
Ipilimumab (NY-ESO-1)	inibidor de ponto de verificação**	ICC	19	EUA	5
VGX-3100	DNA	ELISPOT	17	EUA	1
HIVIS-1	DNA	ELISPOT	12	CEU98%, Asiática1%, Hisp.1%	2
ImMucin	peptídeo	Citotoxicidade	10	israelense	15
NY-ESO-1 OLP	peptídeo	IFN-gama	7	japonesa	7
GVX301	peptídeo	Proliferação	14	CEU	25
vacina WT1	peptídeo	ELISPOT	12	EUA	26
vacina WT1	peptídeo	ICC	18	CEU	18
DPX-0907*	peptídeo	Coloração de multímero	18	canadense	12
Vacina de peptídeos contra melanoma	peptídeo	ELISPOT	26	Branca	27

Tabela 13. Correlação linear entre Escore de PEPI e taxa

de resposta ( $R^2 = 0,7$ ).

Imunoterapia	Taxa de Resposta de Ensaaios Clínicos	Escore de PEPI3+ $\geq 1^*$	OPA
StimuVax (não demonstrou eficácia na Fase III)	20%	2%	10%
vacina gp100	28%	4%	14%
IMA901 fase I	74%	48%	65%
IMA901 fase II	64%	48%	75%
ICT107	33%	52%	63%
ProstVac	45%	56%	80%
Synchrotope TA2M	46%	24%	52%
MELITAC 12.1	49%	47%	96%
vacina WT1	59%	78%	76%
Ipilimumab (NY-ESO-1*)	72%	84%	86%
VGX-3100	78%	87%	90%
HIVIS-1	80%	93%	86%
ImMucin	90%	95%	95%
NY-ESO-1 OLP	100%	84%	84%
GVX301	64%	65%	98%
vacina WT1	83%	80%	96%
vacina WT1	81%	61%	75%
DPX-0907	61%	58%	95%
Vacina de peptídeos contra melanoma	52%	42%	81%
*% de indivíduos na População Modelo com PEPI3+ derivado de vacina $\geq 1$			

[00210] Exemplo 11 - Ensaio *in silico* baseado na identificação de epítomos que se ligam a múltiplos HLA em uma vacina multipeptídica prediz a taxa de resposta imune relatada em ensaios clínicos

[00211] IMA901 é uma vacina terapêutica para câncer de

células renais (CRC) compreendendo 9 peptídeos derivados de peptídeos associados a tumores (TUMAPs) que são naturalmente apresentados no tecido de câncer humano. Um total de 96 indivíduos HLA-A\*02+ com CRC avançado foram tratados com IMA901 em dois estudos clínicos independentes (fase I e fase II). Cada um dos 9 peptídeos de IMA901 foi identificado na técnica anterior como sendo epítomos restritos para HLA-A2. Com base nos padrões atualmente aceitos, todos estes peptídeos são fortes candidatos para aumentar ("boost") as respostas de células T contra o câncer renal nos indivíduos do ensaio, porque sua presença foi detectada em pacientes com câncer renal e porque os pacientes do ensaio foram especificamente selecionados de modo que tivessem pelo menos uma molécula de HLA que tivesse a capacidade de apresentar cada um dos peptídeos.

[00212] Para cada indivíduo na população Modelo, foram determinados quantos dos nove peptídeos da vacina IMA901 tiveram a capacidade de se ligar a três ou a mais HLA. Como cada peptídeo na vacina IMA901 é 9-mérico, isto corresponde à contagem de PEPI3+. Os resultados foram comparados com as taxas de resposta imune relatadas para os ensaios clínicos de Fase I e de Fase II (Tabela 14).

Tabela 14. Taxas de Resposta Imune a IMA901 na População

Modelo e em dois ensaios clínicos

Respostas imunes a TUMAPs	População Modelo (HLA-A2+) (n=180)	Fase I (n=27) *	Fase II (n=64) *
Nenhum peptídeo	39%	25%	36%
1 peptídeo	34%	44%	38%
≥ 2 peptídeos	27% (Escore de Multi-PEPI)	29%	26%
≥ 3 peptídeos	3%	ND	3%

\* Número de pacientes avaliados quanto às respostas imunes

[00213] Os resultados dos estudos de fase I e fase II mostram a variabilidade das respostas imunes à mesma vacina em diferentes coortes dos ensaios. No geral, contudo, houve uma boa concordância entre as taxas de resposta preditas pelo Teste PEPI3+ ≥2 e as taxas de resposta clínica relatadas.

[00214] Em uma análise retrospectiva, os investigadores clínicos dos ensaios discutidos acima verificaram que a probabilidade de os indivíduos que responderam a múltiplos peptídeos da vacina IMA901 terem o controle da doença (doença estável, resposta parcial) foi significativamente ( $p = 0,019$ ) maior do que a de os indivíduos que responderam apenas a um peptídeo ou dos que não tiveram resposta. 6 de 8 indivíduos (75%) que responderam a múltiplos peptídeos tiveram benefício clínico no ensaio, em contraste com 14% e 33% dos respondedores a 0 e 1 peptídeos, respectivamente. O estudo aleatorizado de fase II confirmou que as respostas imunes a múltiplos TUMAPs

estavam associadas a uma maior sobrevida global.

[00215] Como a presença de PEPs predisse com acurácia os respondedores aos TUMAPs, os respondedores clínicos a IMA901 são provavelmente pacientes que podem apresentar PEPs  $\geq 2$  de TUMAPs. Esta subpopulação representa apenas 27% dos pacientes selecionados com HLA-A\*02 e, de acordo com o resultado do ensaio clínico, espera-se que 75% dessa subpopulação tenha benefício clínico. Os mesmos resultados clínicos sugerem que 100% dos pacientes teriam benefício clínico se a seleção dos pacientes fosse baseada em PEPs  $\geq 3$  de TUMAPs, embora esta população represente apenas 3% da população selecionada de pacientes com HLA-A\*02. Estes resultados sugerem que a taxa de controle da doença (doença estável ou resposta parcial) está entre 3% e 27% na população de pacientes que foi investigada nos ensaios clínicos de IMA901. Na ausência de resposta completa, apenas uma porção destes pacientes experienciam benefícios de sobrevivência.

[00216] Esses achados explicam a ausência de melhora na sobrevida no estudo clínico de Fase III com IMA901. Estes resultados também demonstraram que o enriquecimento em HLA-A\*02 da população estudada não foi suficiente para atingir o objetivo primário de sobrevida global no ensaio de Fase III com IMA901. Como observaram os pesquisadores do estudo com

IMA901, é necessário o desenvolvimento de um diagnóstico complementar (CDx) para selecionar prováveis respondedores a vacinas peptídicas. Estes achados também sugerem que a seleção de pacientes com PEPIs específicos para TUMAP  $\geq 2$  pode proporcionar suficiente enriquecimento para demonstrar benefício clínico significativo de IMA901.

[00217] Exemplo 12 - Ensaio *in silico* baseado na identificação de epítomos que se ligam a múltiplos HLA derivados da vacina prediz taxas de resposta clínica experimental relatadas

[00218] Foi determinada uma correlação entre o Escore de PEPI3+  $\geq 2$  das vacinas de imunoterapia determinada na População Modelo descrita no Exemplo 8 e a Taxa de Controle da Doença (TCD, proporção de pacientes com respostas completas e com respostas parciais e doença estável) relatada e determinada em ensaios clínicos.

[00219] Foram identificados em revistas científicas revisadas por pares dezessete ensaios clínicos, conduzidos com vacinas de imunoterapia contra câncer baseadas em peptídeos e DNA, que publicaram Taxas de Controle da Doença (TCDs) ou taxa de resposta objetiva (TRO) (Tabela 15). Estes ensaios envolveram 594 pacientes (5 etnias) e abrangeram 29 antígenos tumorais e virais. As TCDs foram determinadas de acordo com os

Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST), que é o padrão atual para ensaios clínicos, no qual as respostas clínicas são baseadas em mudanças nas dimensões transversais máximas<sup>42, 43, 44</sup>. Caso não houvesse dados de TCD disponíveis, foram usados dados da taxa de resposta objetiva (TRO), que também são definidos de acordo com as diretrizes do RECIST.

[00220] A Tabela 16 compara o Escore de PEPI3+  $\geq 2$  para cada vacina na População Modelo e a TCD ou a TRO publicadas. Foi observada uma correlação entre a TCD predita e a medida, proporcionando-se evidências adicionais de que não apenas a imunogenicidade, mas também a potência das vacinas contra câncer depende das múltiplas sequências de HLA dos indivíduos ( $R^2 = 0,76$ ) (FIG. 9).

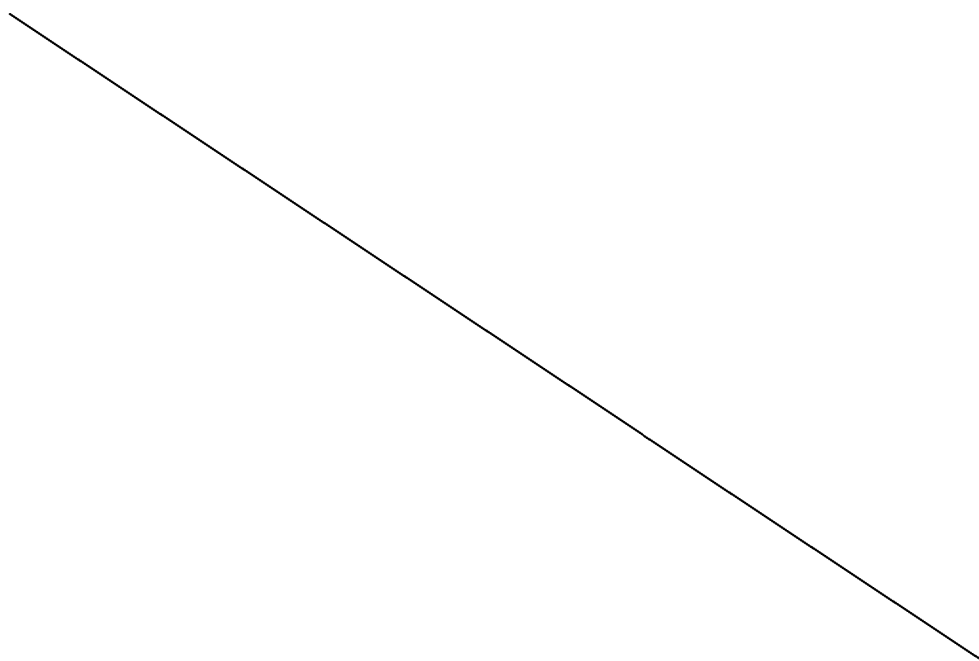


Tabela 15. Ensaios clínicos selecionados para predição da Taxa de Controle da Doença (TCD).

Imunoterapia	Antígeno	Patrocinador ("Sponsor")	Doença	Pop. (n)	Pop. do estudo/Etnia	Restrição HLA	Forma de administração	Dose (mg)	Cronograma de dosagem	Tempo de avaliação (semanas)	Ref.
IMA901 fase I	9 TAAs	Immatics	Câncer de células renais	28	CEU	A02	Idetidade (i.d.)	0,4	8x em 10 semanas	12	19
IMA901 fase II	9 TAAs	Immatics	Câncer de células renais	68	CEU	A02	Idetidade (i.d.)	0,4	7x em 5 semanas e 10x 3 semanas	24	19
Ipilimumab	NY-ESO-1	MSKCC	Melanoma	19	EUA	não	i.v.	0,3 3 10	4 x a cada 3 semanas	24	5
HPV-SLP*	HPV-16 E6, E7	Universidade de Leiden	VIN	20	CEU	não	s.c.	0,3	3 x a cada 3 semanas	12	9
HPV-SLP*		Universidade de Leiden	Câncer cervical relacionado ao HPV	5	CEU	não	s.c.	0,3	3 x a cada 3 semanas	12 (OR)	10
gp100 - 2 peptídeos*	gp100	BMS	Melanoma	136	EUA	A*0201	s.c.	1	4 x a cada 3 semanas	12	28
Immucin	Muc-1	VaxilBio	Mieloma	15	israelense	não	s.c.	0,1	6 x a cada 2 semanas	12**	29
StimuVax	Muc-1	Merck	NSCLC	80	canadense	não	s.c.	1	8x semanais e, então, a cada 6 semanas	12	13, 30
VGX-3100	HPV-16&18	Inovio	Câncer cervical relacionado ao HPV	125	EUA	não	i.m.	6	0, 4, 12 semanas	36	31
Vacina de peptídeo	Timidilato	Universidade de	CRC, NSCLC, de carc.	21	CEU	não	s.c.	0,1 0,2	3 x 3 semanas	12	32



TSPP	sintase	Siena	vesícula biliar, câncer de mama, e câncer gástrico					0,3				
Vacina de peptídeo KIF20A-66*	KIF20A	Hospital de Chiba Tokushukai	Câncer pancreático metastático	29	japonesa	A*2402	s.c.	1 3	2 ciclos 1, 8, 15, 22 dias e, então, a cada 2 semanas	12 (OR)	33	
Vacina de peptídeo*	3 TAAs	Universidade de Kumamoto	HNSCC	37	japonesa	A*2402	s.c.	1	8 x semanais e, então, a cada 4 semanas	12	34	
Vacina de coquetel de 7 peptídeos*	7 TAAs	Universidade de Kinki	Câncer colorretal metastático	30	japonesa	A*2402	s.c.	1	Ciclos: 5 x semanais e, então, 1 semana de descanso	10 (OR)	35	
GVX301*	hTERT	Universidade de Gênova	Câncer de próstata renal	14	japonesa	A02	Identi- ficada (i.d.)	0,5	1, 3, 5, 7, 14, 21, 35, 63 dias	12	25	
MAGE-A3 Trojan*	MAGE-A3	Abramson Cancer Center	Mieloma múltiplo	26	EUA	não	s.c.	0,3	14, 42, 90, 120, 150 dias	24	36	
PepCan	HPV-16 E6	University of Arkansas	CIN2/3	23	EUA	não	i.m.	0,1 0,25 0,5	4 x 3 semanas	24	37	
Vacina de peptídeos contra melanoma*	Tirosinase, gp100	University of Virginia	Melanoma	26	EUA	A1, A2 ou A3	s.c.	0,1	6 ciclos: 0, 7, 14, 28, 35, 42 dias	6	27	
*Montanide ISA51 VG como adjuvante **A resposta da doença foi avaliada de acordo com os critérios de resposta do International Myeloma Working Group <sup>45</sup>												

Tabela 16. As Taxas de Controle da Doença (TCDs) e os Escores de Multi-PEPI (TCD predita) em 17 ensaios clínicos.

Imunoterapia	TCD	(Escore de Multi-PEPI) (TCD predita)	Percentual Geral de Concordância
IMA901 fase I	43%	27%	61%
IMA901 fase II	22%	27%	81%
Ipilimumab	60%	65%	92%
HPV-SLP	60%	70%	86%
HPV-SLP	62%	70%	89%
gp100 - 2 peptídeos	15%	11%	73%
Immucin	73%	59%	81%
StimuVax	0%	0%	100%
VGX-3100	50%	56%	89%
Vacina de peptídeo TSPP	48%	31%	65%
Vacina de peptídeo KIF20A-66*	26%	7%	27%
Vacina de peptídeo	27%	10%	37%
Vacina de coquetel de 7 peptídeos*	10%	9%	90%
GVX301	29%	7%	24%
MAGE-A3 Trojan*	35%	10%	29%
PepCan	52%	26%	50%
Vacina de peptídeos contra melanoma	12%	6%	50%

[00221] Exemplo 13 - Desenho de vacina contra câncer de mama para grande população e composição

[00222] Usamos o Teste PEPI3+ descrito acima para desenhar peptídeos para uso em vacinas contra câncer de mama que sejam efetivas em uma grande porcentagem de pacientes,

levando-se em consideração as heterogeneidades tanto dos antígenos tumorais quanto dos HLAs das pacientes.

[00223] Os CTAs de câncer de mama foram identificados e classificados com base nas frequências gerais de expressão de antígenos encontradas em amostras de tumor de câncer de mama, conforme relatadas em publicações revisadas por pares (Chen et al. Multiple Cancer/Testis Antigens Are Preferentially Expressed in Hormone-Receptor Negative and High-Grade Breast Cancers. Plos One 2011; 6(3): e17876.; Kanojia et al. Sperm-Associated Antigen 9, a Novel Biomarker for Early Detection of Breast Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18(2):630-639.; Saini et al. A Novel Cancer Testis Antigen, A-Kinase Anchor Protein 4 (AKAP4) Is a Potential Biomarker for Breast Cancer. Plos One 2013; 8(2): e57095).

[00224] Com base na taxa de expressão classificada, selecionamos os CTA mais frequentemente expressos como antígenos-alvo da vacina contra câncer de mama. As taxas de expressão dos CTAs específicos para câncer de mama selecionados são ilustradas na Figura 11.

[00225] Para selecionar peptídeos imunogênicos a partir dos CTAs-alvo, usamos o Teste PEPI3+ e a População Modelo descrita no Exemplo 8 para identificar os epítomos 9-méricos (PEPI3+s) que são mais frequentemente apresentados por pelo

menos 3HLAs dos indivíduos na População Modelo. Nós referimo-nos aqui a estes epítopos como "bestEPIs". Um exemplo ilustrativo da análise "PEPI3+ hotspot" e identificação de bestEPI é mostrado na FIG. 10 para o antígeno PRAME.

[00226] Nós multiplicamos a frequência de expressão relatada para cada CTA (N%) pela frequência dos "hotspots" de PEPI3+ na População Modelo para identificar os epítopos de células T (9-méricos) que induzirão uma resposta de células T citotóxicas contra antígenos do câncer de mama na maior proporção de indivíduos (Tabela 17) Em seguida, selecionamos 15-meros que abrangem cada um dos 9-meros selecionados (Tabela 17). Os 15-meros foram selecionados de modo a se ligarem à maioria dos alelos de HLA de classe II da maioria dos indivíduos, usando-se o processo descrito no Exemplo 19 abaixo. Estes 15-meros podem induzir respostas tanto de CTL quanto de T auxiliares na maior proporção de indivíduos.

[00227] Tabela 17. Lista de BestEPI (9 meros sublinhada) para se selecionarem peptídeos de câncer de mama para a composição da vacina. N%: Frequência de expressão de antígenos em cânceres colorretais; B%: frequência de bestEPI, isto é, a porcentagem de indivíduos com epítopos que se ligam a pelo menos 3 HLA de classe I de indivíduos na população modelo (433 indivíduos); HLAI\*\* : \*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+

específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400);

N%\*B%: N% multiplicado por B%.

SEQ ID NO. 9-mérico	SEQ ID NO. 15-mérico	Antígeno		BestePIs e 15-mero Otimizado				
		Antígeno	N%	15-mérico otim.	Posição otim.	B%	HLAII* (CD4)	B%*N%
172	195	PIWIL-2	94%	<u>FVASINLT</u> LTWKYSR	760	67%	93%	64%
173	196	PIWIL-2	94%	RNFYDPTSAMVLQQH	341	60%	49%	57%
1	41	AKAP4	85%	DQVNIDYLMNRPQNL	161	52%	46%	44%
1	197	AKAP4	85%	VNIDYLMNRPQNLRL	163	52%	57%	44%
174	198	EpCam	84%	RTYWIIIELEKHKARE	140	51%	100%	43%
2	42	AKAP4	85%	MMAYSDTTMMSDDID	1	49%	0%	41%
3	43	BORIS	71%	MTSSRMSSFNHRMK	263	57%	66%	40%
3	199	BORIS	71%	VCMFTSSRMSSFNHR	261	57%	96%	40%
175	200	HIWI	100%	HAFDGTILFLPKRLQ	161	39%	83%	39%
4	201	AKAP4	85%	SDLQYALGFQHALS	116	46%	81%	39%
4	44	AKAP4	85%	LQKYALGFQHALSPS	118	46%	88%	39%
24	64	SPAG9	88%	GTGKLGFSFVRITAL	1137	44%	94%	39%
24	202	SPAG9	88%	KLGFSEFVRITALMVS	1140	44%	100%	39%
5	45	SPAG9	88%	AQKMSSLLPTMWLGA	962	43%	69%	38%
176	203	PIWIL-2	94%	YSRVVFQMPHQEIVD	772	40%	77%	38%
177	204	HIWI	100%	GFTTSILQYENSIML	251	37%	86%	37%
178	205	PLU-1	82%	LRRYRLDLDLYPMN	732	45%	84%	37%
179	206	TSGA10	70%	YSSNAYHMSSTMKPN	653	48%	33%	34%
180	207	TSGA10	70%	LQKVQFEKVSALADL	494	46%	97%	32%
181	208	PLU-1	82%	NRTSYLHSPFSTGRS	1321	38%	37%	31%
6	46	SPAG9	88%	GNILDSFTVCNSHVL	779	36%	4%	31%
6	209	SPAG9	88%	LDSFTVCNSHVL CIA	782	36%	6%	31%
7	47	BORIS	71%	NMAFVTSGELVRHRR	319	44%	75%	31%
182	210	ODF-4	63%	NSPLPFQWRITHSFR	63	49%	35%	30%
183	211	SP17	47%	AFAAAYFESLLEKRE	37	65%	100%	30%
184	212	AKAP4	85%	DLSFYVNRLLSLVIQ	216	36%	100%	30%
185	213	ODF-4	63%	QDGRLLSSTLSLSSN	41	47%	75%	29%
186	214	RHOXF-2	60%	WEEAYTFEGARYYIN	62	48%	79%	29%
187	215	PLU-1	82%	EKAMARLQELLTVSE	955	34%	69%	28%
188	216	HIWI	100%	RSIAGFVASINEGMT	642	28%	57%	28%

8	48	PRAME	53%	<u>LERLAYLHARLRELL</u>	457	52%	100%	28%
189	217	RHOXF-2	60%	SDYAVHPMSFVGRTS	132	43%	5%	26%
190	218	NY-SAR-35	55%	<u>MMQMFGLGAISLILV</u>	184	46%	69%	25%
11	51	NY-SAR-35	55%	<u>FSSSGTTSFKCFAPF</u>	163	45%	0%	25%
11	219	NY-SAR-35	55%	<u>LRHKCCFSSSGTTSF</u>	157	45%	1%	25%
9	49	SPAG9	88%	<u>SGAVMSERVSGLAGS</u>	16	28%	9%	25%
10	220	BORIS	71%	<u>RFTQSGTMKIHLQK</u>	406	35%	69%	25%
10	50	BORIS	71%	<u>HTRFTQSGTMKIHL</u>	404	35%	80%	25%
191	221	EpCam	84%	<u>QTLIYYVDEKAPEFS</u>	246	28%	34%	24%
13	222	NY-SAR-35	55%	<u>FVLANGHILPNSENA</u>	97	42%	6%	23%
13	53	NY-SAR-35	55%	<u>CSGSSYFVLANGHIL</u>	91	42%	78%	23%
13	223	NY-SAR-35	55%	<u>SSYFVLANGHILPNS</u>	94	42%	85%	23%
12	224	MAGE-A9	44%	<u>FMFQEALKLKVAELV</u>	102	49%	100%	22%
12	52	MAGE-A9	44%	<u>QLEFMFQEALKLKVA</u>	99	49%	100%	22%
14	54	PRAME	53%	<u>RHSQTLKAMVQAWPF</u>	64	37%	38%	20%
14	225	PRAME	53%	<u>HSQTLKAMVQAWPFT</u>	65	37%	37%	20%
14	226	PRAME	53%	<u>QTLKAMVQAWPFTCL</u>	67	37%	85%	20%
15	55	NY-BR-1	47%	<u>YSCDSRSLFESSAKI</u>	424	39%	0%	18%
16	56	Survivina	66%	<u>TAKKVRRAIEQLAAM</u>	127	26%	26%	17%
192	227	MAGE-A11	59%	<u>SHSYVLVTSLNLSYD</u>	286	26%	100%	15%
192	228	MAGE-A11	59%	<u>TSHSYVLVTSLNLSY</u>	285	26%	100%	15%
17	229	MAGE-A11	59%	<u>AMDAIFGSLSDGSG</u>	184	23%	0%	14%
17	230	MAGE-A11	59%	<u>ESFSPTAMDAIFGSL</u>	178	23%	0%	14%
17	57	MAGE-A11	59%	<u>SPTAMDAIFGSLSDE</u>	181	23%	0%	14%
18	58	HOM-TES-85	47%	<u>MASFRKLTLSKVPP</u>	1	29%	51%	13%
19	59	MAGE-A9	44%	<u>SSISVYYTLWSQFDE</u>	67	30%	97%	13%
20	231	NY-BR-1	47%	<u>KPSAFEPATEMQKSV</u>	582	27%	0%	12%
20	60	NY-BR-1	47%	<u>PGKPSAFEPATEMQK</u>	580	27%	0%	12%
193	232	NY-ESO-1	9%	<u>SRLLEFYLAMPFATP</u>	85	52%	98%	5%
194	233	NY-ESO-1	9%	<u>FYLAMPFATPMEAEEL</u>	90	51%	96%	5%

[00228] Em seguida, desenhamos trinta e um peptídeos

30-méricos. (Tabela 18a). Os 30-meros podem consistir em dois fragmentos 15-méricos otimizados, em geral, a partir de CTAs frequentes diferentes, dispostos de extremidade a extremidade, cada fragmento compreendendo um dos 9-meros (BestEPis) da

Tabela 17. Nove destes peptídeos 30-méricos foram selecionados para um painel de peptídeos, a que se refere como PoliPEPI915 (Tabela 18b). As frequências de expressão para os 10 CTAs que são alvos de PoliPEPI915, individualmente e em combinação, são mostradas na FIG. 11.

Tabela 18a. - peptídeos 30-méricos de vacina contra câncer de mama

SEQID	TREOSID	Antígeno de origem	Peptídeo (30-mérico)	HLAI* (CD8)	HLAII** (CD4)
81	BCV900-2-1	AKAP4	LQKYALGFQHALSPSMAYSDTTMMSDDID	69%	88%
82	BCV900-2-2	BORIS/AKAP4	VCMFTSSRMSSFNRHVNIIDYLMNRPQNLRL	76%	97%
83	BCV900-2-3	BORIS	NMAFVTSGELVRHRRHTRFTQSGTMKIHIL	57%	92%
84	BCV900-2-4	SPAG9	LDSFTVCNSHVLCAKLGFSFVRITAMVS	58%	100%
85	BCV900-2-5	SPAG9/NY-SAR-35	AQKMSSLLPTMWLGAMQMFGLGAI SLILV	66%	83%
86	BCV900-2-6	PRAME	LERLAYLHARLRELLQTLKAMVQAWPFTCL	71%	100%
87	BCV900-2-7	NY-SAR-35	SSYFVLANGHILPNSLRHKCCFSSSGTTSF	64%	85%
88	BCV900-2-8	Survivina/MAGE-A9	TAKKVRRAIEQLAAMQLEFMFQEAALKLKVA	58%	100%
89	BCV900-2-9	MAGE-A11/NY-BR-1	TSHSYVLVTSLNLSYSCDSRSLFESSAKI	65%	100%
90	BCV900-3-1	SPAG9/BORIS	LDSFTVCNSHVLCAVCMFTSSRMSSFNRH	65%	96%
91	BCV900-3-2	NY-SAR-35/PRAME	LRHKCCFSSSGTTSFQTLKAMVQAWPFTCL	59%	85%
92	BCV900-3-3	NY-BR-1/SURVIVINA	YSCDSRSLFESSAKITAKKVRRAIEQLAAM	55%	26%
93	BCV900-3-4	AKAP-4/BORIS	MMAYSDTTMMSDDIDHTRFTQSGTMKIHIL	72%	80%
94	BCV900-3-5	SPAG9/AKAP-4	AQKMSSLLPTMWLGALQKYALGFQHALSPS	64%	92%
95	BCV900-3-6	MAGE-A11/BORIS	TSHSYVLVTSLNLSYNMAFVTSGELVRHRR	61%	100%
96	BCV900-3-7	NY-SAR-35/AKAP-4	MMQMFGLGAI SLILVNIIDYLMNRPQNLRL	71%	84%
97	BCV900-3-8	NY-SAR-35/SPAG-9	SSYFVLANGHILPNSKLGFSEFVRITAMVS	65%	100%
98	BCV900-3-9	PRAME/MAGE-A9	LERLAYLHARLRELLQLEFMFQEAALKLKVA	73%	100%
99	BCV900-4-1	SPAG9/AKAP4	GNILDSFTVCNSHVLQKYALGFQHALSPS	53%	88%
100	BCV900-4-2	BORIS/NY-SAR-35	NMAFVTSGELVRHRRFSSSGTTSFKCFAPF	65%	75%
101	BCV900-4-5	SPAG9/BORIS	AQKMSSLLPTMWLGAMFTSSRMSSFNRHMK	72%	87%
102	BCV900-4-6	MAGE-A11/PRAME	TSHSYVLVTSLNLSYHSQTLKAMVQAWPFT	60%	100%
103	BCV900-5-6	HomTes85/MageA11	MASFRKILTLSEKVPSPPTAMDAIFGSLSDE	45%	51%
104	BCV900-5-7	AKAP4/PRAME	DQVNIDYLMNRPQNLRHSQTLKAMVQAWPF	64%	67%
105	BCV900-5-8	NYSAR/SPAG9	CSGSSYFVLANGHILSGAVMSERVSLAGS	46%	78%

106	BCV900-S-2	AKAP-4/MAGE-A9	DLSFYVNRLLSSLVIQSSISVYYTLWSQFDE	60%	100%
107	BCV900-S-4	SPAG9/NY-ESO-1	SGAVMSERVSGLAGSSRLLEFYLAMPPATP	59%	98%
108	BCV900-S-6	HOM-TES-85/MAGE-A11	MASFRKLTLEKVPPEFSPTAMDAIFGSL	46%	51%
109	BCV900-S-7	NY-ESO-1/NY-BR-1	FYLAMPFATPMEAEKPSAFEPATEMQKSV	60%	96%
110	BCV900-T-27	MAGE-A11/PRAME	AMDAIFGSLSDGSGHSQTLKAMVQAWPFT	54%	37%
111	BCV900-T-28	NY-SAR-35/SPAG9	FVLANGHILPNSENAGTGKLGFSFVRITAL	61%	94%
435	BCV900-6-1	TSGA10 / PIWIL-2	YSSNAYHMSSTMKNFVASINLTITKWYSR	80%	95%
436	BCV900-6-2	PIWIL-2 / AKAP4	RNFYDPTSAMVLQQHMMAYSDTTMMSDDID	88%	49%
437	BCV900-6-3	PLU-1 / RHOXF-2	LRVRYTLDDLYPMNSDYAVHPMSPVGRTS	67%	85%
438	BCV900-6-4	SPAG9 / EpCam	SGAVMSERVSGLAGSRTYWIIIELKHKARE	60%	100%
439	BCV900-6-5	AKAP4 / PLU-1	DLSFYVNRLLSSLVIQNRYSYLHSPFSTGRS	66%	100%
440	BCV900-6-6	AKAP4 / HIWI	VNIDYLMNRPQNRLHAFDGTILFLPKRLQ	70%	94%
441	BCV900-6-7	AKAP4 / PLU-1	SDLQKYALGFQHALSEKAMARLQELLTVSE	56%	92%
442	BCV900-6-8	HIWI / ODF-4	GFTTSILQYENSIMLQDGRLLSSTLSLSSN	61%	94%
443	BCV900-6-9	PIWIL-2 / BORIS	YSRVVFQMPHQEIVDNMAFVTSGELVRHRR	61%	85%
444	BCV900-6-10	SP17 / BORIS	AFAAAFYFESLLEKREMFTSSRMSSFNRHMK	82%	100%
445	BCV900-6-11	ODF-4 / HIWI	NSPLPFQWRITHSFRRSIAGFVASINEGMT	60%	69%
446	BCV900-6-12	NY-SAR-35 / RHOXF-2	SSYFVLANGHILPNSWEEAYTFEGARYYIN	74%	93%
447	BCV900-6-13	TSGA10 / PRAME	LQKVQFEKVSALADLLERLAYLHARLRELL	68%	100%
448	BCV900-6-14	MAGE-A11 / MAGE-A9	SHSYVLVTSNLNSYDFMFQEALKLKVAEIV	65%	100%
449	BCV900-6-15	BORIS / EpCam	RFTQSGTMKIHLQKQTLIYYVDEKAPEFS	53%	80%

Tabela 18b - Peptídeos Selecionados da Vacina contra Câncer de Mama para o painel/composição de PoliPEPI915

SEQID	TREOSID	Antígeno de origem	Peptídeo (30-mérico)	HLAI* (CD8)	HLAII** (CD4)
99	BCV900-4-1	SPAG9/AKAP4	GNILDSFTVCNSHVLLQKYALGFQHALSPS	53%	75%
100	BCV900-4-2	BORIS/NY-SAR-35	NMAFVTSGELVRHRRFSSSGTTSFKCFAPF	65%	46%
92	BCV900-3-3	NY-BR-1/SURVIVINA	YSCDSRSLFESSAKITAKKVRRATFQLAAM	55%	11%
93	BCV900-3-4	AKAP-4/BORIS	MMAYSDTTMMSDDIDHTRFTQSGTMKIHL	72%	45%
101	BCV900-4-5	SPAG9/BORIS	AQKMSSLLFTMWLGAMFTSSRMSSFNRHMK	72%	50%
103	BCV900-5-6	HomTes85/MageA11	MASFRKLTLEKVPPEFSPTAMDAIFGSLSDE	45%	16%
104	BCV900-5-7	AKAP4/PRAME	DQVNIDYLMNRPQNRLRHSQTLKAMVQAWPF	64%	33%
105	BCV900-5-8	NYSAR/SPAG9	CSGSSYFVLANGHILSGAVMSERVSGLAGS	46%	48%
98	BCV900-3-9	PRAME/MAGE-A9	LERLAYLHARLRELLQLEFMFQEALKLKVA	73%	100%
			PoliPEPI915 (9 peptídeos em conjunto)	96%	100%



\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI3+ específicos para células T CD8+ na HLA de classe I População Modelo (n=433).

\*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+ específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400).

[00229] Caracterização de PoliPEPI915

[00230] A heterogeneidade dos tumores pode ser abordada incluindo-se sequências peptídicas que têm como alvo múltiplos CTAs em um regime de vacina ou de imunoterapia. A composição PoliPEPI915 tem como alvo 10 CTAs diferentes. Com base nas taxas de expressão de antígenos para estes 10 CTAs, modelamos o número médio predito de antígenos expressos (AG50) e o número mínimo de antígenos expressos com probabilidade de 95% (AG95) nas células cancerígenas. 95% dos indivíduos expressaram no mínimo 4 dos 10 antígenos alvo (AG95=4), como mostrado pela curva de expressão de antígenos na **FIG. 12**.

[00231] Os valores de AG descritos acima caracterizam uma vacina independentemente da população de pacientes-alvo. Eles podem ser usados para prever a probabilidade de um câncer específico (por exemplo, câncer de mama) expressar antígenos que são alvos de uma composição específica de vacina ou de imunoterapia. Os valores de AG são baseados na heterogeneidade conhecida dos tumores, mas não levam em consideração a heterogeneidade de HLA.

[00232] A heterogeneidade de HLA de uma determinada população pode ser caracterizada do ponto de vista de uma composição de imunoterapia ou de vacina pelo número de antígenos representando PEPI3+. Estes são os antígenos de CTA específicos da vacina para os quais se prediz  $PEPI3+ \geq 1$ , aos quais aqui se refere como "AP". O número médio de antígenos com PEPI3+ (AP50) mostra como a vacina pode induzir resposta imune contra os antígenos que são alvos da composição (resposta imune específica da vacina contra o câncer de mama). A composição PoliPEPI915 pode induzir resposta imune contra uma média de 5,3 antígenos da vacina (AP50=5,30) e 95% da População Modelo pode induzir resposta imune, contra pelo menos um antígeno da vacina (AP95=1) (FIG. 13).

[00233] As vacinas podem ainda ser caracterizadas por valores de AGP que se referem a antígenos com PEPIs". Este parâmetro é a combinação dos dois parâmetros anteriores: (1) AG depende das frequências de expressão de antígenos no tipo de tumor específico, mas não do genótipo de HLA dos indivíduos da população, e (2) AP depende do genótipo de HLA dos indivíduos em uma população sem levar em consideração as frequências de expressão do antígeno. O AGP depende de ambos, das frequências de expressão dos antígenos vacinais na doença e do genótipo de HLA dos indivíduos em uma população.

[00234] Combinando os dados de AG de câncer de mama e de AP na população modelo, determinamos o valor de AGP de PoliPEPI915 que representa a distribuição de probabilidades de antígenos da vacina que induzem respostas imunes contra antígenos expressos em tumores de mama. Para PoliPEPI915, o valor de AGP50 na População Modelo é de 3,37. O AGP92=1 significa que 92% dos indivíduos na População Modelo induzem respostas imunes contra, pelo menos, um antígeno de vacina expresso (FIG. 14).

[00235] Exemplo 14 - Seleção de pacientes usando-se testes diagnósticos complementares para vacina contra câncer de mama

[00236] A probabilidade de um paciente específico ter uma resposta imune ou uma resposta clínica ao tratamento com um ou mais peptídeos da vacina contra câncer, por exemplo, como descrito acima, pode ser determinada com base (i) na identificação de PEPI3+ no(s) peptídeo(s) da vacina (epítomos 9-méricos que têm a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA do paciente); e/ou (ii) em uma determinação da expressão de antígenos-alvo em células cancerígenas do paciente, por exemplo, conforme medido em uma biópsia do(s) tumor(es). Idealmente, ambos os parâmetros são determinados e a combinação ideal de peptídeos de vacina é selecionada para uso no

tratamento do paciente. No entanto, a análise de PEPI3+ sozinha pode ser usada se uma determinação dos antígenos tumorais expressos, por exemplo por biópsia, não for possível, desaconselhada ou se não for confiável devido a erro de biópsia (isto é, amostras de tecido de biópsia retiradas de uma pequena porção do tumor ou de tumores metastatizados não representam o repertório completo de CTAs expressos no paciente).

[00237] Exemplo 15 - Comparação de PoliPEPI915 com as vacinas concorrentes contra câncer de mama

[00238] Nós usamos o modelo de ensaio clínico in silico descrito acima para predizer as taxas de resposta imune de vacinas concorrentes contra câncer de mama que tenham sido investigadas em ensaios clínicos (Tabela 19). A taxa de resposta imune destes produtos ficou entre 3% e 91%.

[00239] As vacinas de peptídeo único foram imunogênicas em 3% - 23% dos indivíduos. Em comparação, peptídeos tendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 81-111 foram imunogênicos em 44% a 73% dos indivíduos nas mesmas coortes. Este resultado representa uma melhora substancial na imunogenicidade de cada peptídeo em PoliPEPI915.

[00240] As taxas de resposta imune dos produtos peptídicos combinados concorrentes ficaram entre 10-62%. O produto combinado PoliPEPI915 inventado foi de 96% na população

modelo e de 93% em uma população de pacientes com câncer de mama, representando melhora na imunogenicidade.

Tabela 19. Taxas preditas de resposta imune de vacinas concorrentes contra câncer de mama

Vacinas contra Câncer de Mama	Patrocinadores ("Sponsors")	Antígenos-Alvo	Taxas de resposta imune preditas*	
			433 doadores normais (População Modelo)	90 pacientes com câncer de mama
DPX0907 Multipeptídeo	ImmunoVaccine Tech.	7	58%	62%
Vacina multipeptídica	University of Virginia	5	22%	31%
Ad-sig-hMUC-1/ecdCD40L	Singapore CRI	1	91%	80%
NY-ESO-1 IDC-G305	Immune Design Corp.	1	84%	84%
DC pulsada com peptídeo 6 HER2	University of Pennsylvania	1	29%	36%
Peptídeo de Células B HER-2	Ohio State University	1	18%	23%
Proteína HER-2/neu ID	University of Washington	1	10%	11%
Peptídeo NeuVax	Galena Biopharma	1	6%	3%
Peptídeo StimuVax® (L-BLP25)	EMD Serono	1	6%	8%
PoliPEPI915	Treos Bio	10	96%	93%

\* Proporção de indivíduos com PEPI3+  $\geq 1$

[00241] Uma outra melhoria em usar a vacina PoliPEPI915 é a menor chance de escape de tumor. Cada peptídeo 30-mérico em PoliPEPI915 tem como alvos 2 antígenos tumorais. CTLs contra mais antígenos tumorais são mais efetivos contra células tumorais heterólogas do que CTLs contra um único antígeno tumoral.

[00242] Uma outra melhoria da vacina PoliPEPI915 é que indivíduos que provavelmente respondam à vacinação podem ser identificados com base em seus genótipos de HLA (sequência) e, opcionalmente, na expressão de antígenos em seus tumores, usando-se os métodos aqui descritos. As composições

farmacêuticas com vacinas PoliPEPI não serão administradas a indivíduos cujo HLA não pode apresentar nenhum PEPI3 a partir das vacinas. Durante os ensaios clínicos, será feita correlação entre o mAGP ou o número de AGP no regime PoliPEPI915 e a duração das respostas do indivíduo. Uma combinação de vacina com AGP > 1 é mais provavelmente necessária para destruir células tumorais heterólogas.

[00243] As composições farmacêuticas com vacinas PoliPEPI não serão administradas a indivíduos cujo HLA não pode apresentar nenhum PEPI3 a partir das vacinas.

[00244] Exemplo 16 Desenho e composição de vacina contra câncer colorretal

[00245] Mostramos um outro exemplo para a composição da vacina colorretal usando o mesmo método de desenho demonstrado acima. Usamos o Teste PEPI3+ descrito acima para desenhar peptídeos para uso em vacinas contra câncer colorretal que sejam efetivas em uma grande porcentagem de pacientes, levando em consideração as heterogeneidades tanto dos antígenos tumorais quanto dos HLAs dos pacientes.

[00246] Os CTAs de câncer colorretal foram identificados e classificados com base nas frequências gerais de expressão de antígenos encontrados em amostras de tumores de câncer colorretal, conforme relatado em publicações

revisadas por pares (FIG. 15) (Choi J, Chang H. The expression of MAGE and SSX, and correlation of COX2, VEGF, and survivin in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2012. 32(2):559-564.; Goossens-Beumer IJ, Zeestraten EC, Benard A, Christen T, Reimers MS, Keijzer R, Sier CF, Liefers GJ, Morreau H, Putter H, Vahrmeijer AL, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014. 110(12):2935-2944.; Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clinical Cancer Res* 2005. 11(5):1809-1814).

[00247] Com base na taxa de expressão classificada, selecionamos os CTA mais frequentemente expressos como antígenos-alvo da vacina contra câncer colorretal. As taxas de expressão dos CTAs específicos para câncer de mama selecionados são ilustradas na Figura 15.

[00248] Para selecionar peptídeos imunogênicos a partir dos CTAs de câncer colorretal mais frequentemente expressos, usamos o Teste PEPI3+ e a População Modelo descritos no Exemplo 8 para identificar os "bestEPis".

[00249] Nós multiplicamos a frequência de expressão relatada para cada CTA (N%) pela frequência dos "hotspots" de

PEPI3+ na População Modelo (B%) para identificar os epítomos de células T (9-méricos) que induzirão uma resposta imune contra antígenos do câncer colorretal na maior proporção de indivíduos (Tabela 20) Em seguida, selecionamos 15-meros que abrangem cada um dos 9-meros selecionados (Tabela 20). Os 15-meros foram selecionados de modo a se ligarem à maioria dos alelos de HLA de classe II da maioria dos indivíduos, usando-se o processo descrito no Exemplo 19 abaixo. Estes 15-meros podem induzir respostas tanto de CTL quanto de T auxiliares na maior proporção de indivíduos.

[00250] Tabela 20. Lista de BestEPI (9-meros sublinhados) para se selecionarem peptídeos de câncer colorretal para a composição da vacina. N%: Frequência de expressão de antígenos em cânceres colorretais; B%: frequência de bestEPI, isto é, a porcentagem de indivíduos com epítomos que se ligam a pelo menos 3 HLA de classe I de indivíduos na população modelo (433 indivíduos); HLAII\*\*: \*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+ específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400); N%\*B%: N% multiplicado por B%.

SEQ ID NO. 9-mérico	SEQ ID NO. 15-mérico	Antígeno		BestEPIs e 15-mero Otimizado				
		Antígeno	N%	15-Mero otim.	Posição otim.	B%	HLAII** (CD4)	B%*N%
234	251	TSP50	89%	VCSMEGTWYLVGLVS	315	58%	72%	52%
21	252	TSP50	89%	GFSYEQDPTLRDPEA	105	51%	0%	45%



21	61	TSP50	89%	RSCGFSYEQDPTLRD	102	51%	0%	45%
21	253	TSP50	89%	YRSCGFSYEQDPTLR	101	51%	0%	45%
22	62	EpCAM	88%	VRTYWIIIELKHKAR	139	51%	100%	45%
235	254	EpCAM	88%	LLAAATATFAAAQEE	12	39%	28%	34%
24	255	SPAG9	74%	KLGFSEVRITALMVS	1140	44%	100%	33%
23	63	TSP50	89%	PSTTMTQFPVSEGG	83	36%	0%	32%
24	64	SPAG9	74%	GTGKLGFSEVRITAL	1137	44%	94%	32%
23	256	TSP50	89%	LPSTTMTQFPVSEGG	82	36%	0%	32%
25	65	SPAG9	74%	AQKMSSLLPTMWLGA	962	43%	69%	32%
26	66	CAGE1	74%	LASKMHSLALMVGL	613	42%	99%	31%
27	67	FBXO39	39%	KFMNPPYNAVLTKKFQ	95	78%	43%	30%
28	68	CAGE1	74%	PKSMTMMPALFKENR	759	37%	87%	27%
238	257	SPAG9	74%	LDSFTVCNSHVLICIA	782	36%	6%	27%
236	258	SPAG9	74%	GNILDSFTVCNSHVL	779	36%	4%	26%
29	69	EpCAM	88%	YVDEKAPEFSMQGLK	251	28%	0%	25%
29	259	EpCAM	88%	QTLIYYVDEKAPEFS	246	28%	34%	25%
30	70	FBXO39	39%	FKKTMSTFHNVLVSLN	216	58%	92%	23%
31	71	Survivina	86%	TAKKVRRAIEQLAAM	127	26%	26%	22%
237	260	TSP50	89%	SRTLALLALPLPLSLL	368	24%	100%	21%
32	72	SPAG9	74%	SGAVMSERVSGLAGS	16	28%	9%	21%
238	260	TSP50	89%	SRTLALLALPLPLSLL	368	23%	100%	20%
34	74	FBXO39	39%	KVNFFFERIMKYERL	284	46%	100%	18%
33	73	TSP50	89%	SRYRAQRFWSWGQA	190	20%	88%	18%
239	261	LEMD1	56%	FIIIVFVYLTVENKS	164	30%	97%	17%
240	66	CAGE1	74%	LASKMHSLALMVGL	613	22%	99%	16%
241	262	FBXO39	39%	RNSIRSSFISLSLFF	142	40%	100%	16%
242	263	CAGE1	74%	NIENYSTNALIQFVD	97	21%	14%	16%
243	264	Survivina	86%	MGAPTLPPAWQPFLK	1	17%	0%	15%
244	265	CAGE1	74%	RQFETVCKFHWEAF	119	18%	45%	13%
35	75	Survivina	86%	KDHRISTFKNWPFLE	15	15%	83%	13%
36	266	MAGE-A8	44%	PEEAIWEALSVMGLY	220	20%	78%	9%
36	76	MAGE-A8	44%	SRAPEEAIWEALSVM	217	20%	6%	9%
37	77	MAGE-A8	44%	DEKVAELVRFLLRKY	113	18%	95%	8%
37	267	MAGE-A8	44%	EKVAELVRFLLRKYQ	114	18%	99%	8%
38	268	MAGE-A6	28%	KLLTQYFVQENYLEY	244	27%	98%	8%
38	78	MAGE-A6	28%	QYFVQENYLEYRQVP	248	27%	93%	8%

40	80	MAGE-A6	28%	IGHVYIFATCLGLSY	172	25%	82%	7%
39	79	MAGE-A8	44%	EFLWGPRALAETSYV	273	16%	44%	7%
245	269	MAGE-A3	23%	IGHLYIFATCLGLSY	172	28%	85%	6%
246	270	MAGE-A3	23%	KLLTQHFVQENYLEY	244	27%	77%	6%
247	271	MAGE-A8	44%	ASSSTLIMGTLEEV	39	14%	19%	6%
248	269	MAGE-A3	23%	IGHLYIFATCLGLSY	172	25%	85%	6%
249	264	Survivina	86%	MGAPTLPFAWQPFLLK	1	5%	0%	4%
250	75	Survivina	86%	KDHRISTFKNWPFLE	15	4%	83%	3%

[00251] Em seguida, desenhamos trinta e um peptídeos 30-méricos. (Tabela 21a). Cada um dos 30-meros consiste em dois fragmentos 15-méricos otimizados, em geral, de diferentes CTAs frequentes, cada 30-mero contendo, em geral, pelo menos um PEPI que se liga a HLA de classe II de alta frequência. Os fragmentos 15-méricos estão dispostos de extremidade a extremidade e cada um compreende um dos - meros (BestEPIs) da Tabela 20, como descrito acima. Nove destes peptídeos 30-méricos foram selecionados para um painel de vacinas de peptídeos, a que se refere como PoliPEPI915 (Tabela 21b). As frequências de expressão para os 8 CTAs que são alvos de PoliPEPI1015, individualmente e em combinação, são mostradas na FIG. 15.

Tabela 21a - peptídeos 30-méricos de vacina contra câncer colorretal

SEQ ID	TREOSID	Antígeno de origem	Peptídeo (30-mérico)	HLAI* (CD8)	HLAII* (CD4)
112	CCV1000-1-1	TSP50	VCSMEGTWYLVGLVSYRSCGFSYEQDPTLR	71%	72%
113	CCV1000-1-2	EpCAM/TSP50	VRTYWIIIEELKHKARLPSTTMTQFPVSEG	62%	100%
114	CCV1000-1-4	Survivina	TAKKVRRRAIEQLAAMMGAPTLPFAWQPFLLK	39%	26%
115	CCV1000-1-5	CAGE1	LASKMHSLLALMVGLPKSMTMPALFKENR	68%	99%

116	CCV1000-1-6	Spag9	KLGFSEFVRITALMVSLSFTVCNSHVLICIA	58%	100%
117	CCV1000-1-7	FBXO39	KFMNPYNAVLTKKFQFKKTMSTFHNLVSLN	91%	92%
118	CCV1000-1-8	Spag9/FBXO39	AQKMSSLLPTMWLGAKVNFFFERIMKYERL	75%	100%
119	CCV1000-1-9	Survivina/Mage-A8	KDHRISTFKNWPFLEPEEAIWEALSMGLY	39%	93%
120	CCV1000-2-1	TSP50	YRSCGFSYEQDPTLRVCSMEGTWYLVGLVS	71%	72%
121	CCV1000-2-2	EpCAM/Survivina	VRTYWIIEELKHKARTAKKVRRAIEQLAAM	57%	100%
122	CCV1000-2-4	TSP50/Spag9	LPSTTMETQFPVSEGLGFSFVRITALMVS	61%	100%
123	CCV1000-2-5	Survivina/Mage-A8	MGAPTLPAPWQPFLEPEEAIWEALSMGLY	40%	78%
124	CCV1000-2-6	CAGE1/Survivina	LASKMHSLLLALMVGLKDHRISTFKNWPFLE	58%	99%
125	CCV1000-2-7	CAGE1/Spag9	PKSMTMMPALFKENRLDSFTVCNSHVLICIA	61%	87%
126	CCV1000-2-8	FBXO39	KFMNPYNAVLTKKFQKVNFFFERIMKYERL	90%	100%
127	CCV1000-2-9	Spag9/FBXO39	AQKMSSLLPTMWLGAFKKTMTSTFHNLVSLN	67%	92%
128	CCV1000-3-1	TSP50	GFSYEQDPTLRDPEAVCSMEGTWYLVGLVS	71%	72%
129	CCV1000-3-7	CAGE1/Spag9	PKSMTMMPALFKENRGNILDSFTVCNSHVL	61%	87%
130	CCV1000-5-1	TSP50	PSTTMETQFPVSEGKSRYRAQRFWSWVGQA	53%	88%
131	CCV1000-5-3	EpCAM /Mage-A8	YVDEKAPEFSMQGLKDEKVAELVRFLLRKY	43%	95%
132	CCV1000-5-4	TSP50/Spag9	RSCGFSYEQDPTLRDGTGLGFSFVRITAL	67%	94%
133	CCV1000-5-5	Mage-A8/Mage-A6	SRAPPEEAIWEALSMQYFVQENYLEYRQVP	45%	94%
134	CCV1000-5-7	CAGE1/Spag9	PKSMTMMPALFKENRSGAVMSERVSGLAGS	57%	87%
135	CCV1000-S-1	SPAG9/FBXO39	SGAVMSERVSGLAGSRNSIRSSFISLSFF	64%	100%
136	CCV1000-S-2	CAGE1/MAGE-A8	NIENYSTNALIQPVDEKVAELVRFLLRKYQ	28%	99%
137	CCV1000-S-3	CAGE1/MAGE-A6	RQFETVCKFHWVEAFKLLTQYFVQENYLEY	46%	98%
138	CCV1000-S-5	MAGE-A8/MAGE-A3	EFLWGPRLAETS YVKKLLTQH FVQENYLEY	39%	91%
139	CCV1000-S-6	MAGE-A8/EpCAM	ASSSSTLIMGTLEEVQTLIYYVDEKAPEFS	41%	41%
140	CCV1000-S-7	TSP50/MAGE-A3	SRTLLLLALPLPLSLIGHLYIFATCLGLSY	60%	100%
141	CCV1000-S-9	LEMD1/MAGE-A6	FIIVVFVYLTVENKSIGHVYIFATCLGLSY	51%	99%
142	CCV1000-S-17	EPCAM	LLAAATATFAAAQEEQTLIYYVDEKAPEFS	52%	54%

\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI3+ específicos para células T CD8+ na População Modelo (n=433).

\*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+ específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400).

Tabela 21b - Peptídeos selecionados da Vacina contra Câncer Colorretal para a composição PoliPEPI1015

SEQID	TREOSID	Antígeno de origem	Peptideo (30-mérico)	HLAI* (CD8)	HLAII** (CD4)
130	CCV1000-5-1	TSP50	PSTTMETQFPVSEGKSRYRAQRFSWVGQA	53%	53%
121	CCV1000-2-2	EpCAM/Survivina	VRTYWIIIELKHKARTAKKVRRAIEQLAAM	57%	98%
131	CCV1000-5-3	EpCAM /Mage-A8	YVDEKAPEFSMQGLKDEKVAELVRFLLRKY	43%	72%
132	CCV1000-5-4	TSP50/Spag9	RSCGFSYEQDPTLRDGTGKLGFSFVRITAL	67%	82%
133	CCV1000-5-5	Mage-A8/Mage-A6	SRAPEEAIWEALSVMQYFVQENYLEYRQVP	45%	76%
124	CCV1000-2-6	CAGE1/Survivina	LASKMHSLALMVGLKDHRISTFKNWPFLE	58%	95%
134	CCV1000-5-7	CAGE1/Spag9	EKSMTMPALFKENRSGAVMSERVSGLAGS	57%	57%
126	CCV1000-2-8	FBX039	KFMNFPYNAVLTKKFQKVNFFFERIMKYERL	90%	98%
127	CCV1000-2-9	Spag9/FBX039	AQKMSSLLPTMWLGAFKKTMTFHNLVSLN	67%	66%
			PoliPEPI915 (9 peptideos em conjunto)	100%	99%

\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI3+ específicos para células T CD8+ na População Modelo (n=433).

\*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+ específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400).

#### [00252] Caracterização da vacina contra o câncer colorretal PoliPEPI1015

[00253] Heterogeneidade do tumor: A composição PoliPEPI915 tem como alvo 8 CTAs diferentes (Fig. 15). Com base nas taxas de expressão de antígenos para estes 8 CTAs, AG50 = 5,22 e AG95 = 3 **FIG. 16.**

[00254] Heterogeneidade do paciente: o AP50=4,73 e AP95=2 (AP95=2) (FIG. 17). Heterogeneidade do tumor e do paciente: AGP50 = 3,16 e AGP95 = 1 (População Modelo) (FIG. 18).

[00255] Exemplo 17 - Comparação de peptídeos de vacina contra câncer colorretal com vacinas contra câncer colorretal concorrentes

[00256] Nós usamos o modelo de ensaio clínico *in silico* descrito acima para determinar a taxa de respondedores de células T a vacinas peptídicas contra CRC de última geração e atualmente disponíveis e comparamos com a de poliPEPI1015 (Tabela 22). Nosso teste PEPI3+ demonstra que as vacinas concorrentes podem induzir respostas imunes contra um antígeno tumoral em uma fração dos indivíduos (2% - 77%). No entanto, a determinação da resposta multi-antigênica (multi-PEPI) para as 2 vacinas multi-antigênicas concorrentes resultou em nenhum ou 2% de respondedores. As \*% de respondedores são a razão entre indivíduos da População Modelo e PEPI3+  $\geq 1$  para HLAI (respostas de células T CD8+) no caso de 1, ou para 2, 3, 4 ou 5 antígenos das composições de vacina. Como as respostas multi-PEPI se correlacionam com as respostas clínicas induzidas por vacinas contra tumores, é improvável que qualquer uma das vacinas concorrentes demonstre benefício clínico em 98% dos pacientes. Em contraste, predissemos respostas multi-PEPI em 95% dos indivíduos, sugerindo a probabilidade de benefício clínico na maioria dos pacientes.

[00257] Tabela 22 Taxas de resposta imune preditas de

poliPEPI1015 e vacinas concorrentes contra câncer colorretal

Vacinas contra Câncer Colorretal	Patrocinador ("Sponsor")	% de respondedores de células T CD8+ em 433 indivíduos*					
		Antígenos vacinais (Ags)	% de respondedores contra múltiplos Ags				
			1 Ag	2 Ags	3 Ags	4 Ags	5 Ags
Vacina peptídica Stimuvax® (L-BLP25)	Universidade Johannes Gutenberg Mainz	1	6%	-	-	-	-
Vacina multipeptídica WT1	Universidade de Shinshu, Japão	1	79%	-	-	-	-
Vacina de Coquetel de Peptídeos Multiepitópos	Universidade de Kinki	7	5%	2%	0%	0%	0%
Vacina sintética de Peptídeo Longo p53	Centro Médico da Universidade de Leiden	1	77%	-	-	-	-
Vacina de Peptídeo de Células B HER-2	Ohio State University Comprehensive Cancer Center	1	18%	-	-	-	-
Vacina de células dendríticas pulsadas com peptídeo NY-ESO-1	Jonsson Comprehensive Cancer Center	1	0%	-	-	-	-
OCV-C02	Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.	2	2%	0%	-	-	-
<b>PoliPEPI 1015</b>	<b>Treos Bio</b>	<b>8</b>	<b>100%</b>	<b>95%</b>	<b>87%</b>	<b>70%</b>	<b>54%</b>

[00258] Exemplo 18 Desenho e composição de vacina contra câncer de ovário

[00259] Usamos o Teste PEPI3 + para desenhar peptídeos para uso em vacinas contra câncer de ovário, usando essencialmente o mesmo método de desenho descrito nos Exemplos 13 e 16 acima.

[00260] Nós multiplicamos a frequência de expressão relatada para CTAs associados a câncer de ovário (N%) pela frequência dos "hotspots" de PEPI3+ na População Modelo (B%) para identificar os epítomos de células T (9-méricos) que induzirão uma resposta imune contra antígenos do câncer de ovário na maior proporção de indivíduos (Tabela 23) Em seguida, selecionamos 15-meros que abrangem cada um dos 9-meros selecionados (Tabela 23). Os 15-meros foram selecionados de modo a se ligarem à maioria dos alelos de HLA de classe II da maioria dos indivíduos, usando-se o processo descrito no Exemplo 20 abaixo.

Tabela 23. Lista de BestEPI (9-meros sublinhados) para se selecionarem peptídeos de câncer de ovário para a composição da vacina. N%: Frequência de expressão de antígenos em cânceres colorretais; B%: frequência de bestEPI, isto é, a porcentagem de indivíduos com epítomos que se ligam a pelo menos 3 HLA de classe I de indivíduos na população modelo (433 indivíduos); HLAII\*\*: \*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+ específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400); N%\*B%: N% multiplicado por B%.

SEQ ID NO. 9- mérico	SEQ ID NO. 15- mérico	Antígeno		BestEPIs e 15-mero Otimizado				
		Antígeno	N%	15-Mero otim.	Posição otim.	B%	HLAII* (CD4)	B%*N%

272	302	PIWIL-4	90%	<u>QGMMSIATKIAMQM</u>	585	79%	72%	71%
273	303	PIWIL-4	90%	<u>KAKAFDGAILEFLSQK</u>	153	62%	80%	56%
274	304	WT1	63%	<u>SSGQARMFPNAPYLP</u>	121	78%	0%	49%
275	305	EpCam	92%	<u>RTYWIIIEELKHKARE</u>	140	51%	100%	47%
276	306	BORIS	82%	<u>MFTSSRMSSFNRHMK</u>	263	57%	66%	46%
277	307	AKAP4	88%	<u>QVNIDYLMNRPQNLR</u>	162	52%	46%	46%
278	308	OY-TES-1	65%	<u>STPMIMENIQELIRS</u>	277	67%	82%	43%
279	309	AKAP4	88%	<u>MMAYSDDTTMSDDID</u>	1	49%	0%	43%
280	310	SP17	65%	<u>AFAAAYFESLLEKRE</u>	37	65%	100%	42%
281	311	PIWIL-4	90%	<u>RAIQQYVDPDVQLVM</u>	534	46%	5%	42%
282	312	PIWIL-2	61%	<u>GFVASINLTLTWKYS</u>	759	67%	93%	41%
283	313	AKAP4	88%	<u>DLQKYALGFQHALSP</u>	117	46%	82%	40%
284	314	PIWIL-3	88%	<u>GYVTSVLQYENSITL</u>	266	44%	54%	39%
285	315	SPAG9	90%	<u>VREEAQKMSSLLPTM</u>	958	43%	1%	39%
286	316	PIWIL-3	88%	<u>MSLKGHLQSVTAPMG</u>	523	42%	17%	37%
287	317	PIWIL-3	88%	<u>QKSIAGFVASTNAEL</u>	663	42%	37%	37%
288	318	PIWIL-2	61%	<u>RNFYDPTSAMVLQQH</u>	341	60%	49%	37%
289	319	BORIS	82%	<u>NMAFVTSGELVRHRR</u>	319	44%	75%	36%
290	320	AKAP4	88%	<u>LSFYVNRLSSLVIQM</u>	217	36%	100%	31%
291	321	PRAME	59%	<u>LERLAYLHARRELL</u>	457	52%	100%	30%
292	322	BORIS	82%	<u>RFTQSGTMKIHLQK</u>	406	35%	69%	29%
293	323	HIWI	68%	<u>HAFDGTILFLPKRLQ</u>	161	39%	83%	27%
294	324	EpCam	92%	<u>YVDEKAPEFSMQGLK</u>	251	28%	0%	26%
295	325	SPAG9	90%	<u>SGAVMSERVSGLAGS</u>	16	28%	9%	25%
296	326	HIWI	68%	<u>GFTTSILQYENSIML</u>	251	37%	86%	25%
297	327	PIWIL-2	61%	<u>YSRVVFQMPHQEIVD</u>	772	40%	77%	24%
298	328	PRAME	59%	<u>RHSQTLKAMVQAWPF</u>	64	37%	38%	22%
299	329	Survivina	84%	<u>AKKVRRAIEQLAAMD</u>	128	26%	25%	22%
300	330	BORIS	82%	<u>ERSDEIVLTVSNSNV</u>	210	25%	2%	21%
301	331	WT1	63%	<u>RTPYSSDNLYQMTSQ</u>	218	32%	0%	20%

[00261] Em seguida, desenhamos 15 peptídeos 30-méricos (Tabela 24).

Tabela 24 - peptídeos 30-méricos de vacina contra câncer



de ovário

SEQID	TREOSID	Antígeno de origem	Peptídeo (30-mérico)	HLAI* (CD8)	HLAII** (CD4)
332	OC1212-01	OY-TES-1/PIWIL-4	STPMIMENIQELIRSQGMMSIATKIAMQM	94%	98%
333	OC1212-02	PIWIL-2/PIWIL-4	RNFYDPTSAMVLQQHKAKAFDGAIFLSQK	89%	90%
334	OC1212-03	BORIS/AKAP4	NMAFVTSSELVRRMMAYSDDTTMSDDID	68%	75%
335	OC1212-04	WT1/WT1	SSGQARMFPNAPYLPRTPYSSDNLQMTSQ	84%	0%
336	OC1212-05	BORIS/HIWI	MFTSSRMSSFNRHMKHAFDGTILFLPKRLQ	67%	94%
337	OC1212-06	PIWIL-2/EpCam	YSRVVFQMPHQEIVDRTYWIIELKHKARE	67%	100%
338	OC1212-07	AKAP4/PIWIL-4	LSFYVNRLLSLVIQMRAIQQYVDPDVQLVM	71%	100%
339	OC1212-08	AKAP4/ SP17	QVNIDYLMNRFQNLRAFAAAYFESLLEKRE	78%	100%
340	OC1212-09	PIWIL-3/PIWIL-3	GYVTSVLQYENSITLQKSIAGFVASTNAEL	64%	65%
341	OC1212-10	SPAG9/BORIS	VREEAQKMSLLPTMRFTQSGTMKIHLQK	62%	69%
342	OC1212-11	PIWIL-2/EpCam	GFVASINLTITKWYSYVDEKAPEFSMQGLK	74%	93%
343	OC1212-12	PIWIL-3/SPAG9	MSLKGHLQSVTAPMGSGAVMSERVSGLAGS	52%	19%
344	OC1212-13	AKAP4/PRAME	DLQKYALGFQHALSPLERLAYLHARLRELL	67%	100%
345	OC1212-14	HIWI/BORIS	GFTTSILQYENSIMLERSDEIVLTVSNSNV	49%	86%
346	OC1212-15	PRAME/Survivina	RHSQTLKAMVQAWPFAKKVRRRAIEQLAAMD	48%	42%

\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI3+ específicos para células T CD8+ na População Modelo (n=433).  
 \*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI4+ específicos para células T CD4+ em doadores normais (n=400).

[00262] Exemplo 19. Eficácia por procedimento de desenho exemplificada para a vacina PoliPEPI1018 contra câncer colorretal

[00263] A composição de vacina contra Câncer Colorretal (CRC) PoliPEPI1018 (PoliPEPI1018) é uma vacina peptídica destinada a ser usada como imunoterapia complementar às opções "standard-of-care" para CRC em pacientes identificados como prováveis respondedores ao usarem um teste diagnóstico

complementar (CDx) *in vitro*. Estão sendo realizados ensaios clínicos nos EUA e na Itália para avaliar PoliPEPI1018 em pacientes com câncer colorretal metastático. O produto contém 6 peptídeos (6 dos peptídeos 30-méricos de PoliPEPI1015 descritos nos exemplos 16 e 17) misturados com o adjuvante Montanide. Os 6 peptídeos foram selecionados para induzir respostas de células T contra 12 epítomos de 7 antígenos de câncer/testículo (CTAs) que são mais frequentemente expressos em CRC. Os 6 peptídeos foram otimizados para induzir respostas duradouras de células T específicas para CRC. Pacientes que são respondedores prováveis com respostas de células T contra múltiplos CTAs expressos no tumor podem ser selecionados com um diagnóstico complementar (CDx). Este exemplo define o processo de precisão usado para desenhar PoliPEPI1018. Este processo pode ser aplicado para desenhar vacinas contra outros tipos de câncer e doenças.

A. Seleção de Múltiplos Antígenos como Alvos

[00264] A seleção de antígenos tumorais é essencial para a segurança e eficácia de vacinas contra o câncer. A característica de um bom antígeno é ter expressão restrita em tecidos normais, de modo a impedir a autoimunidade. Várias categorias de antígeno atendem a esse requisito, incluindo antígenos que sofreram mutação de maneira exclusiva (por

exemplo, p53), antígenos virais (por exemplo, antígenos de papilomavírus humano no câncer cervical), e antígenos de diferenciação (por exemplo, CD20 no linfoma de células B).

[00265] Os inventores selecionaram múltiplos antígenos de câncer/testículo (CTAs) como antígenos alvo, uma vez que são expressos em vários tipos de células tumorais e em células testiculares, mas não são expressos em outros tecidos ou células somáticas normais. CTAs são alvos desejáveis para vacinas pelo menos pelos seguintes motivos:

- tumores de maior grau histológico e estágio clínico posterior geralmente apresentam maior frequência de expressão de CTAs
- apenas uma subpopulação de células tumorais expressa um determinado CTA
- tipos diferentes de câncer são significativamente diferentes em sua frequência de expressão de CTAs
- tumores positivos para um CTA geralmente mostram expressão simultânea de mais de um CTA
- Nenhum dos CTAs parece ser antígeno de superfície celular, portanto, estes são alvos únicos para vacinas contra o câncer (não são alvos adequados para imunoterapias baseadas em anticorpos)

[00266] Para identificar os CTAs-alvo de PoliPEPI1018, os inventores construíram uma base de conhecimento de expressão de CTAs. Esta base de conhecimento contém CTAs que são expressos em CRC classificados por ordem da taxa de expressão. Os estudos de correlação conduzidos pelos inventores (ver Exemplo 11) sugerem que as vacinas que induzem respostas de CTL contra múltiplos antígenos que são expressos em células tumorais podem beneficiar pacientes. Portanto, sete CTAs com altas taxas de expressão em CRC foram selecionados para inclusão no desenvolvimento de PoliPEPI1018. Os detalhes são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 CTAs-alvo na vacina PoliPEPI1018 CRC

Nome do CTA	Taxa de Expressão	Caracterização
TSP50	89,47%	<i>Proteína 50 semelhante à Protease Específica para Testículo</i> é um oncogene que induz a proliferação celular, invasão celular, e crescimento tumoral. Está frequentemente expressa em amostras de câncer gástrico, mamário, cervical e colorretal; e raramente expressa em tecidos humanos normais, exceto nos espermatócitos dos testículos.
EpCAM	88,35%	<i>Molécula de Adesão de Células Epiteliais</i> é um antígeno associado a tumor, expressa em cânceres de cólon e superexpressa em vários carcinomas humanos. A alta expressão de EpCAM nas células-tronco iniciadoras de câncer faz dela um valioso alvo para vacinas contra câncer. EpCAM também é expressa em níveis baixos ou desprezíveis em células epiteliais normais, com exceção do epitélio escamoso, hepatócitos e queratinócitos.

Survivina	87,28%	<i>Survivina (proteína 5 contendo repetição IAP Baculoviral)</i> é uma proteína multitarefa que promove proliferação celular e inibe apoptose. Embora seja fortemente expressa em tecidos fetais e necessária para o desenvolvimento normal, não é expressa na maioria dos tecidos adultos. Survivina é expressa em vários cânceres, incluindo carcinomas. Tecidos normais que expressam baixo nível de survivina incluem timo, células-tronco derivadas da medula óssea CD34 <sup>+</sup> , e epitélio basal do cólon. A superexpressão dramática de survivina em comparação com os tecidos normais é observada em tumores no pulmão, mama, cólon, estômago, esôfago, pâncreas, bexiga, útero, ovários, linfoma de células grandes não Hodgkin, leucemias, neuroblastoma, melanoma e cânceres de pele não melanoma.
CAGE1	74,47%	<i>Proteína do gene 1 associada a câncer</i> é um CTA típico, que pode desempenhar um papel na proliferação celular e na tumorigênese. CAGE1 é altamente expressa em tecidos de câncer colorretal e fracamente expressa na mucosa colorretal normal adjacente. Além disso, a CAGE1 é expressa em melanoma, hepatoma e tumores de mama. Nenhuma expressão de proteína CAGE1 é detectada em tecidos humanos saudáveis, com exceção dos testículos.
SPAG9	74,36%	<i>Antígeno 9 associado a esperma</i> está envolvido na sinalização da quinase de N-terminal de c-Jun e funciona como uma proteína de esqueleto ("scaffold"), desempenhando, assim, um papel importante na sobrevivência celular, proliferação, apoptose e desenvolvimento de tumores. A expressão da SPAG9 foi detectada em pacientes com câncer epitelial de ovário (90%), câncer de mama (88%), câncer cervical (82%), câncer de células renais (88%) e câncer colorretal (74%). Nenhum dos tecidos não cancerosos adjacentes mostrou expressão do antígeno. A expressão de SPAG9 é restrita ao testículo.
FBXO39	38,60%	<i>FBXO39 (BCP-20)</i> é uma proteína específica do testículo e uma parte importante do complexo da ubiquitina ligase E3. Participa da ubiquitinação e tem um papel na regulação do ciclo celular, respostas imunes, sinalização e degradação proteassomal de proteínas. A FBXO39 é expressa em cânceres de cólon e de mama. A expressão de FBXO39 também foi detectada no ovário, placenta e pulmão. A expressão de FBXO39 é 100 vezes maior nos testículos e 1.000 vezes maior nos cânceres colorretais em comparação com o tecido normal.
MAGEA8	43,75%	A função do <i>antígeno 8 associado ao melanoma</i> não é conhecida, embora possa desempenhar um papel no desenvolvimento embrionário e na transformação tumoral ou em aspectos da progressão tumoral. O gene MAGE-A8 é expresso em CRC e carcinoma hepatocelular. A expressão de MAGE-A8 em tecidos normais é restrita ao testículo e à placenta.

[00267] B. O Direcionamento Preciso é Conseguído pelo

Desenho de Vacinas Baseadas em Biomarcadores PEPI3+

[00268] Como descrito acima, o biomarcador PEPI3+ prediz respostas de células T induzidas pela vacina de um indivíduo. Os inventores desenvolveram e validaram um teste para identificar com acurácia os PEPIs a partir de sequências de antígenos e genótipos de HLA (Exemplos 1, 2, 3). O algoritmo do Teste PEPI foi usado para identificar os PEPIs dominantes (besEPIS) a partir dos 7 CTAs-alvo a serem incluídos na vacina PoliPEPI1018 CRC.

[00269] Os PEPIs dominantes identificados com o processo aqui descrito podem induzir respostas de CTL na maior proporção de indivíduos:

i. Identificação de todos os PEPIs que se ligam a HLA de classe I a partir dos 7 alvos de CTA em cada um dos 433 indivíduos na População Modelo

ii. Identificação dos PEPIs dominantes (BestEPIS) que são PEPIs presentes na maior subpopulação.

[00270] Os 12 PEPIs dominantes que são derivados a partir dos 7 CTAs em PoliPEPI1018 são apresentados na tabela a seguir. A % de PEPI na População Modelo indica a proporção de 433 indivíduos com o PEPI indicado, ou seja, a proporção de indivíduos em que o PEPI indicado pode induzir respostas de CTL. Existe uma variabilidade muito alta (18% - 78%) nos PEPIs

dominantes para induzir respostas de CTL, apesar das etapas de otimização usadas no processo de identificação.

Tabela 26 HLA de classe I específico para CRC que se liga a PEPIs dominantes em PoliPEPI1018

PEPI3 + dominante para cada um dos 7 CTAs em PoliPEPI1018 em pacientes com CRC			
Peptídeos em PoliPEPI1018	Antígenos de CRC	PEPI3+ dominante	% de PEPI3+ na População Modelo
CRC-P1	TSP50	TTMETQFPV	36%
		YRAQRFWSW	20%
CRC-P2	EpCAM	RTYWIIIEL	51%
	Survivina	RAIEQLAAM	26%
CRC-P3	EpCAM	YVDEKAPEF	28%
	MAGE-A8	KVAELVRFL	18%
CRC-P6	CAGE1	KMHSLALM	42%
	Survivina	STFKNWPFL	15%
CRC-P7	CAGE1	KSMTMMPAL	37%
	SPAG9	VMSERVSGL	28%
CRC-P8	FBXO39	FMNPYNAVL	78%
		FFFERIMKY	46%

[00271] Os inventores otimizaram cada PEPI dominante para se ligarem à maioria dos alelos de HLA de classe II da maioria dos indivíduos. Isto deve aumentar a eficácia, porque induzirá células T auxiliares CD4+ que podem aumentar as respostas de CTL CD8+ e contribuir para respostas duradouras de células T. O exemplo apresentado na Figura 4 demonstra que PEPIs que se ligam a  $\geq 3$  alelos de HLA de classe II muito provavelmente ativam células T auxiliares.

[00272] Os peptídeos 15-méricos selecionados com o processo aqui descrito contêm PEPIs dominantes que se ligam a

HLA de classe I e da classe II. Portanto, estes peptídeos podem induzir respostas tanto de CTL quanto de T auxiliares na maior proporção de indivíduos.

[00273] Processo:

1. Identificação do genótipo de HLA de classe II de 400 doadores normais\*

2. Extensão de cada PEPI dominante 9-mérico (Tabela 20) de ambos os lados com aminoácidos que correspondem ao antígeno fonte

3. Predição de PEPIs de HLA de classe II de 400 doadores normais usando-se um algoritmo IEDB

4. Seleção do peptídeo 15-mérico com a maior proporção de indivíduos tendo PEPIs que se ligam a HLA de classe II

5. Garantir a presença de um PEPI de HLA de classe II dominante em cada peptídeo da vacina ao se unirem dois peptídeos 15-méricos

[00274] Os 12 peptídeos 15-méricos otimizados derivados a partir dos 7 CTAs em PoliPEPI1018 são apresentados na Tabela 27. Estes peptídeos têm diferentes características de ligação a HLA de classe II. Existe uma alta variabilidade (0% - 100%) na capacidade de geração de PEPI (ligação a  $\geq 3$  HLA) entre estes peptídeos, apesar de um desenho tão otimizado de vacinas personalizadas.



Tabela 27 PEPIs que se ligam a HLA de classe II específicos para antígenos em PoliPEPI1018.

N°	Antígenos de CRC	Média de Alelos que se ligam a HLA de classe II	% de indivíduos com $\geq 1$ ligação a HLA de classe II	% de indivíduos com $\geq 2$ ligações a HLA de classe II	% de indivíduos com $\geq 3$ ligações a HLA de classe II	% de indivíduos com $\geq 4$ ligações a HLA de classe II
CRC-P1	TSP50 (83-97)	0	0%	0%	0%	0%
	<b>TSP50 (190-204)</b>	<b>4</b>	100%	99%	88%	<b>53%</b>
CRC-P2	<b>EPCAM(139-153)</b>	<b>5</b>	100%	100%	100%	<b>98%</b>
	SURVIVINA (127-141)	2	84%	58%	26%	11%
CRC-P3	EPCAM(251-265)	0	0%	0%	0%	0%
	<b>MAGE-A8 (113-127)</b>	<b>4</b>	100%	100%	95%	<b>72%</b>
CRC-P6	<b>CAGE1 (613-627)</b>	<b>5</b>	100%	100%	99%	<b>95%</b>
	SURVIVINA (15-29)	3	100%	97%	83%	45%
CRC-P7	<b>CAGE1 (759-773)</b>	<b>3</b>	100%	98%	87%	<b>56%</b>
	SPAG9 (16-30)	1	66%	35%	9%	2%
CRC-P8	FBXO39 (95-109)	3	100%	94%	43%	13%
	<b>FBXO39 (284-298)</b>	<b>5</b>	100%	100%	100%	<b>98%</b>

[00275] Os peptídeos 30-méricos da vacina têm as seguintes vantagens em comparação com peptídeos mais curtos:

(i) Múltiplos imunógenos específicos para tumores selecionados de maneira precisa: cada 30-mero contém dois peptídeos imunogênicos específicos para câncer selecionados de maneira precisa que têm a capacidade de induzir respostas de CTL e de T auxiliares na maioria da população relevante (similar à população modelo).

(ii) Garantem a apresentação natural de antígenos. Polipeptídeos com 30 meros de comprimento podem ser vistos como pró-fármacos: Eles não são biologicamente ativos por si mesmos, mas são processados em peptídeos menores (de 9 a 15 aminoácidos de comprimento) para serem carregados nas moléculas de HLA de células apresentadoras de antígenos profissionais. A apresentação de antígenos resultante da vacinação com peptídeos longos reflete as vias fisiológicas para a apresentação nas moléculas de HLA tanto da classe I quanto da classe II. Além disso, o processamento de peptídeos longos nas células é muito mais eficiente do que o de proteínas grandes intactas.

(iii) Excluem indução de respostas de células T tolerantes. Os peptídeos 9-mericos não requerem processamento por células apresentadoras de antígenos profissionais e, portanto, ligam-se exogenamente às moléculas de HLA de classe I. Assim, peptídeos curtos injetados ligar-se-ão em grande número às moléculas de HLA de classe I de todas as células nucleadas que têm HLA de superfície da classe I. Em contraste, peptídeos com > 20-meros de comprimento são processados por células apresentadoras de antígenos antes de se ligarem a HLA de classe I. Portanto, a vacinação com peptídeos longos tem menos probabilidade de levar à tolerância e promoverá a atividade antitumoral desejada.

(iv) Induzem respostas duradouras de células T, porque podem estimular respostas de T auxiliares ao se ligar a várias moléculas de HLA de classe II

(v) Utilidade. A fabricação, formulação, controle de qualidade e administração BPF de um número menor de peptídeos (cada um com todas as características acima) são mais viáveis do que um número maior de peptídeos que fornecem características diferentes.

[00276] Cada peptídeo 30-mérico em PoliPEPI1018 consiste em 2 PEPIs dominantes que se ligam a HLA de classe I e pelo menos um PEPI forte que se liga a HLA de classe II. PEPIs que se ligam fortemente a 4 alelos de HLA de classe II em >50% dos indivíduos. Portanto, os peptídeos da vacina são adaptados aos alelos de HLA tanto da classe I quanto da classe II de indivíduos em uma população geral (que é uma população relevante para o desenho da vacina contra CRC).

[00277] Como demonstrado acima, a alta variabilidade do genótipo de HLA nos indivíduos resulta em alta variabilidade das respostas de células T induzidas por PoliPEPI1018. Isto justifica o codesenvolvimento de um CDx que determine prováveis respondedores. Os biomarcadores PEPI3+ e >2PEPI3+ poderiam prever a resposta imune e respostas clínicas, respectivamente, de indivíduos vacinados com PoliPEPI1018,

conforme detalhado nos Exemplos 11 e 12. Estes biomarcadores serão usados para codesenvolver um CDx que prediga respondedores prováveis à vacina PoliPEPI1018 CRC.

[00278] Exemplo 20 - Análise da composição e da imunogenicidade da vacina PoliPEPI1018 CRC

[00279] Os peptídeos selecionados para a composição de PoliPEPI1018 são mostrados na Tabela 28.

Tabela 28 - Peptídeos Selecionados da Vacina contra Câncer Colorretal para a composição de PoliPEPI1018

SEQID	TREOSID	Antígeno de origem	Peptídeo (30-mérico)	HLAI* (CD8)	HLAII** (CD4)
130	CCV1000-5-1	TSP50	PSTTMETQFPVSEGKSRVRAQRFSWSVGQA	53%	88%
121	CCV1000-2-2	EpCAM/Survivina	VRTYWIIIEELKHKARTAKKVRRAIEQLAAM	57%	100%
131	CCV1000-5-3	EpCAM /Mage-A8	YVDEKAPEFSMQGLKDEKVAELVRFLLRKY	43%	95%
124	CCV1000-2-6	Cage/Survivina	LASKMHSLALMVGLKDHRISTFKNWPFFLE	58%	99%
134	CCV1000-5-7	Cage/Spag9	PKSMTMPALFKENRSGAVMSERVSGLAGS	57%	87%
126	CCV1000-2-8	FBXO39	KFMNPYNAVLTKKFQKVNFFFERIMKYERL	90%	100%
			PoliPEPI1018 (6 peptídeos em conjunto)	98%	100%

\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI3+ que se ligam a HLA de classe I na População Modelo (n=433).

\*\*Porcentagem de indivíduos tendo PEPI3+ que se ligam a HLA de classe II na População Modelo (n=433).

[00280] Os peptídeos de PoliPEPI1018 são formulados em duas misturas, MIX1 contendo os peptídeos de SEQ ID: 130, 131 e MIX2 contendo os peptídeos de SEQ ID: 121, 124, 134, 126.

MIX 1 e MIX 2 podem ser administradas sequencialmente.

[00281] Caracterização da imunogenicidade

[00282] Os inventores usaram o Teste PEPI3+ para caracterizar a imunogenicidade de PoliPEPI1018 em uma coorte de 37 pacientes com CRC com dados completos do genótipo de HLA. As respostas de células T foram preditas em cada paciente contra os mesmos peptídeos 9-merico que serão utilizados em ensaios clínicos. Estes peptídeos representam os 12 PEPI3+ dominantes nos peptídeos PoliPEPI1018. Os 9-meros são mostrados na Tabela 26.

[00283] A especificidade e a sensibilidade da predição de PEPI3+ dependem do número real de HLAs que se prediz que se liguem a um epítopo em particular. Especificamente, os inventores determinaram que a probabilidade de um epítopo restrito a HLA induza uma resposta de células T em um indivíduo é tipicamente de 4%, o que explica a baixa sensibilidade dos métodos de predição de última geração com base na predição de epítopos restritos a HLA. Aplicando a metodologia PEPI3+, os inventores determinaram a probabilidade com que a resposta de células T a cada um dos PEPI3+ dominantes específicos seria induzida por PoliPEPI1018 nos 37 pacientes com CRC. Os resultados desta análise estão resumidos na Tabela 29.

Tabela 29: Probabilidade de PEPI Dominante nos 6 Peptídeos de PoliPEPI1018 em 37 pacientes com CRC

Pacientes com CRC	CRC-P1		CRC-P2		CRC-P3		CRC-P6		CRC-P7		CRC-P8		Número Esperado de PEPIs
	TSP50 (83-97)	TSP50 (190-204)	EpCAM (139-153)	Survivin (127-141)	EpCAM (251-265)	MAGEA8 (113-127)	CAGE1 (613-627)	Survivin (15-29)	CAGE1 (759-773)	SPAG9 (16-30)	FBXO39 (95-109)	FBXO39 (284-298)	
CRC-01	22%	4%	22%	4%	22%	22%	100%	1%	98%	84%	100%	22%	5,01
CRC-02	22%	1%	22%	22%	22%	22%	100%	1%	98%	22%	100%	98%	5,29
CRC-03	84%	22%	84%	22%	22%	22%	84%	22%	22%	22%	100%	22%	5,29
CRC-04	22%	84%	22%	4%	22%	4%	98%	4%	4%	22%	100%	84%	4,70
CRC-05	22%	22%	4%	4%	22%	4%	98%	1%	4%	4%	100%	84%	3,68
CRC-06	84%	22%	4%	84%	98%	4%	22%	4%	4%	4%	100%	98%	5,27
CRC-07	22%	22%	22%	22%	22%	4%	98%	1%	22%	22%	100%	84%	4,41
CRC-08	22%	22%	22%	98%	84%	22%	84%	22%	22%	22%	100%	84%	6,04
CRC-09	22%	84%	84%	84%	84%	22%	100%	4%	22%	22%	98%	84%	7,10
CRC-10	4%	98%	22%	22%	4%	4%	4%	22%	22%	22%	98%	84%	4,06
CRC-11	22%	22%	4%	4%	22%	4%	84%	1%	4%	4%	98%	84%	3,53
CRC-12	84%	22%	4%	22%	4%	4%	84%	4%	84%	4%	100%	22%	4,38
CRC-13	84%	22%	4%	22%	84%	4%	84%	1%	1%	4%	100%	98%	5,07
CRC-14	22%	84%	4%	4%	22%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	84%	4,16
CRC-15	84%	22%	22%	22%	22%	4%	84%	4%	22%	4%	100%	84%	4,74
CRC-16	4%	84%	4%	4%	22%	4%	84%	1%	4%	22%	100%	84%	4,16
CRC-17	84%	84%	4%	84%	84%	4%	4%	4%	4%	4%	100%	22%	4,82
CRC-18	84%	22%	22%	84%	84%	4%	22%	22%	4%	4%	100%	84%	5,36
CRC-19	22%	22%	22%	22%	22%	4%	98%	4%	22%	22%	100%	84%	4,45
CRC-20	84%	22%	4%	22%	84%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	98%	5,10

Pacientes com CRC	CRC-P1		CRC-P2		CRC-P3		CRC-P6		CRC-P7		CRC-P8		Número Esperado de PEPIs
	TSP50 (83-97)	TSP50 (190-204)	EpCAM (139-153)	Survivin (127-141)	EpCAM (251-265)	MAGEA8 (113-127)	CAGE1 (613-627)	Survivin (15-29)	CAGE1 (759-773)	SPAG9 (16-30)	FBXO39 (95-109)	FBXO39 (284-298)	
CRC-21	22%	22%	22%	22%	84%	22%	98%	4%	4%	22%	100%	84%	5,06
CRC-22	22%	98%	84%	4%	22%	22%	84%	22%	84%	22%	98%	22%	5,84
CRC-23	84%	84%	84%	84%	84%	22%	84%	84%	84%	4%	100%	84%	8,82
CRC-24	22%	22%	4%	4%	22%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	84%	3,55
CRC-25	22%	84%	22%	4%	22%	4%	84%	4%	22%	4%	100%	84%	4,56
CRC-26	84%	22%	4%	22%	84%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	84%	4,97
CRC-27	22%	22%	4%	4%	22%	4%	98%	1%	4%	4%	100%	84%	3,68
CRC-28	84%	22%	4%	22%	84%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	98%	5,10
CRC-29	84%	84%	4%	22%	22%	4%	84%	1%	22%	22%	100%	84%	5,33
CRC-30	84%	22%	4%	22%	84%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	98%	5,10
CRC-31	22%	84%	22%	4%	4%	4%	22%	1%	4%	4%	98%	84%	3,53
CRC-32	84%	84%	4%	84%	22%	4%	4%	4%	4%	4%	98%	84%	4,80
CRC-33	84%	22%	4%	22%	84%	4%	84%	1%	4%	4%	100%	98%	5,10
CRC-34	22%	22%	22%	22%	22%	4%	84%	1%	22%	4%	100%	84%	4,09
CRC-35	22%	4%	4%	1%	22%	4%	4%	1%	4%	4%	84%	84%	2,37
CRC-36	22%	4%	4%	1%	22%	4%	4%	1%	4%	4%	84%	84%	2,37
CRC-37	22%	4%	4%	1%	22%	4%	4%	1%	4%	4%	84%	84%	2,37

Abreviações: CRC = câncer colorretal; PEPI = epítipo pessoal

[00284] Nota: As porcentagens representam a probabilidade de Respostas de células

T CD8+ Induzidas por PoliPEPI1018.

[00285] Em geral, estes resultados mostram que o peptídeo mais imunogênico em PoliPEPI1018 é CRC-P8, que se prediz que se ligue a > 3 HLAs na maioria dos pacientes. O peptídeo menos imunogênico, CRC-P3, liga-se a >1 HLA em muitos pacientes e tem 22% de chance de induzir respostas de células T. Como os bioensaios usados para detectar respostas de células T são menos precisos do que PEPI3+, este cálculo pode ser a caracterização mais acurada das respostas de células T em pacientes com CRC. Embora MAGE-A8 e SPAG9 fossem imunogênicos na População Modelo usada para o desenho da vacina, PEPI3+ específicos para MAGE-A8 estavam ausentes nos 37 pacientes com CRC e apenas um paciente (3%) apresentou PEPI3+ específico para SPAG9.

[00286] Caracterização adicional da taxa de resposta predita de PoliPEPI1018 na população modelo descrita no Exemplo 8 e em 295 pacientes com CRC com genótipos conhecidos de HLA classe I são mostrados nas Tabelas 30 e 31.

Tabela 30 – Taxas de Resposta de PoliPEPI1018 na População Modelo (433 doadores normais)

PoliPEPI1018 Taxas de Resposta	>=1	>=2	>=3	>=4	>=5	>=6	>=7	>=8	>=9
Multi-PEPI	98%	94%	83%	70%	52%	38%	27%	18%	11%
Multi-Peptídeo	98%	91%	73%	52%	30%	12%	N/D	N/D	N/D
Multi-Antígeno	98%	92%	72%	49%	31%	14%	6%	N/D	N/D



Tabela 31 - Taxas de Resposta de PoliPEPI1018 para 295 pacientes com CRC

PoliPEPI1018 Taxas de Resposta	>=1	>=2	>=3	>=4	>=5	>=6	>=7	>=8	>=9
Multi-PEPI	99%	96%	92%	85%	69%	53%	40%	32%	25%
Multi-Peptídeo	99%	93%	86%	71%	49%	29%	N/D	N/D	N/D
Multi-Antígeno	99%	93%	86%	72%	49%	32%	13%	N/D	N/D

[00287] *Caracterização da toxicidade - immunoBLAST*

[00288] Foi desenvolvido um método que pode ser realizado com qualquer antígeno para se determinar seu potencial de induzir reação imunotóxica, como autoimunidade. Refere-se aqui ao método como immunoBLAST. PoliPEPI1018 contém seis polipeptídeos 30-méricos. Cada polipeptídeo consiste em dois fragmentos de peptídeo 15-méricos derivados de antígenos expressos em CRC. Os neoepítomos podem ser gerados na região da junção dos dois peptídeos 15-méricos e podem induzir respostas indesejadas de células T contra células saudáveis (autoimunidade). Isto foi avaliado usando-se a metodologia immunoBLAST.

[00289] Foi desenhado um peptídeo 16-mérico para cada um dos componentes 30-méricos de PoliPEPI1018. Cada 16-mero contém 8 aminoácidos da extremidade dos 15 primeiros resíduos do 30-mero e 8 aminoácidos do início dos segundos 15 resíduos do 30-mero - abrangendo, assim, com precisão, a região da

junção dos dois 15-meros. Estes 16-meros são, então, analisados para identificar regiões reativas cruzadas de similaridade local com sequências humanas usando-se BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que compara sequências de proteínas a bases de dados de sequências e calcula a significância estatística das correspondências. Foram selecionados 8-meros dentro dos 16-meros como o comprimento de exame, pois esse comprimento representa o comprimento mínimo necessário para um peptídeo formar um epítopo e é a distância entre os pontos de ancoragem durante a ligação a HLA.

[00290] Como mostrado na Figura 19, as posições dos aminoácidos em um polipeptídeo são numeradas. As posições iniciais de potenciais peptídeos 9-méricos que podem se ligar a HLAs e formar neoepítomos são os 8 aminoácidos nas posições 8-15. As posições iniciais dos peptídeos derivados de antígeno tumoral abrigadas pelos 15-meros que podem formar os epítomos farmacologicamente ativos têm  $7+7=14$  aminoácidos nas posições 1-7 e 16-22. A razão entre possíveis peptídeos geradores de neoepítomos é de 36,4% (8/22).

[00291] O Teste PEPI3+ foi usado para identificar neoepítomos e neoPEPI entre os epítomos 9-méricos na região da junção. O risco de PoliPEPI1018 induzir respostas indesejadas

de células T foi avaliado nos 433 indivíduos na População Modelo determinando-se a proporção de indivíduos com PEPI3+ entre os 9-meros na região da junção. O resultado da análise de neoepítomos/neoPEPI está resumido na Tabela 32. Nos 433 indivíduos da População Modelo, o número médio predito de epítomos que poderiam ser gerados por processamento intracelular foi de 40,12. Neoepítomos foram gerados frequentemente; 11,61 dos 40,12 (28,9%) epítomos são neoepítomos. A maioria dos peptídeos pôde ser identificada como sendo um neoepítomo, mas o número de indivíduos que apresentam neoepítomos variou.

[00292] Os epítomos abrigados por PoliPEPI1018 criam uma média de 5,21 PEPI3+. Estes PEPIs podem ativar células T em um indivíduo. A quantidade de potenciais neoPEPIs foi muito menor do que neoepítomos (3,7%). Há uma possibilidade marginal de estes neoPEPIs competirem na ativação de células T com PEPIs em alguns indivíduos. É importante ressaltar que as células T específicas para neoPEPIs e ativadas não tinham quaisquer alvos no tecido saudável.

Tabela 32 - Identificação de Potenciais Neoepítomos de PoliPEPI1018

PoliPEPI ID do Peptídeo :	Neoepítipo  Potencial	Epítipo e ligação de PEPI3+ em 433 Indivíduos da População Modelo							
		Ligação de Epítipo (1 x HLA)				Ligação de PEPI3+ (3 x HLA)			
		Nº Ind.	% Ind.	NeoEPI	NeoEPI contag em	Nº Ind.	% Ind.	NeoPEPI	Contage m de NeoPEPI
CRC-P1	QFPVSEGKS	0	0,0%		7	0	0,0%		3
	FPVSEGKSR	160	37,0%	X		1	0,2%	X	
	PVSEGKSR	150	34,6%	X		0	0,0%		
	VSEGKSR	194	44,8%	X		1	0,2%	X	
	SEGKSR	113	26,1%	X		0	0,0%		
	EGKSR	77	17,8%	X		0	0,0%		
	GKSR	37	8,5%	X		0	0,0%		
	KSR	337	77,8%	X		33	7,6%	X	
CRC-P2	IELKHKART	32	7,4%	X	7	0	0,0%		1
	ELKHKARTA	63	14,5%	X		0	0,0%		
	LKHKARTAK	59	13,6%	X		0	0,0%		
	KHKARTAKK	166	38,3%	X		1	0,2%	X	
	HKARTAKKV	0	0,0%			0	0,0%		
	KARTAKKVR	70	16,2%	X		0	0,0%		
	ARTAKKVR	134	30,9%	X		0	0,0%		
	RTAKKVRRA	41	9,5%	X		0	0,0%		
CRC-P3	EFSMQGLKD	0	0,0%		5	0	0,0%		1
	FSMQGLKDE	188	43,4%	X		0	0,0%		
	SMQGLKDEK	138	31,9%	X		0	0,0%		
	MQGLKDEKV	16	3,7%	X		0	0,0%		
	QGLKDEKVA	0	0,0%			0	0,0%		
	GLKDEKVAE	0	0,0%			0	0,0%		
	LKDEKVAEL	186	43,0%	X		3	0,7%	X	
	KDEKVAELV	51	11,8%	X		0	0,0%		
CRC-P6	LLALMVGLK	252	58,2%	X	7	0	0,0%		1
	LALMVGLKD	86	19,9%	X		0	0,0%		
	ALMVGLKDH	65	15,0%	X		0	0,0%		
	LMVGLKDHR	97	22,4%	X		0	0,0%		
	MVGLKDHR	67	15,5%	X		0	0,0%		
	VGLKDHRIS	0	0,0%			0	0,0%		
	GLKDHRIST	4	0,9%	X		0	0,0%		
	LKDHRISTF	195	45,0%	X		5	1,2%	X	
CRC-P7	PALFKENRS	0	0,0%		5	0	0,0%		1
	ALFKENRSG	0	0,0%			0	0,0%		
	LFKENRSGA	41	9,5%	X		0	0,0%		
	FKENRSGAV	114	26,3%	X		0	0,0%		
	KENRSGAVM	261	60,3%	X		0	0,0%		
	ENRSGAVMS	0	0,0%			0	0,0%		
	NRSGAVMSE	227	52,4%	X		0	0,0%		
	RSGAVMSER	197	45,5%	X		2	0,5%	X	
CRC-P8	AVLTKKFQK	181	41,8%	X	7	0	0,0%		3
	VLTKKFQKV	208	48,0%	X		2	0,5%	X	
	LTKKFQKVN	0	0,0%			0	0,0%		
	TKKFQKVN	25	5,8%	X		0	0,0%		
	KKFQKVNFF	250	57,7%	X		12	2,8%	X	
	KFQKVNFFF	273	63,0%	X		23	5,3%	X	
	FQKVNFFFE	163	37,6%	X		0	0,0%		
	QKVNFFFER	110	25,4%	X		0	0,0%		

Abreviações: CRC = câncer colorretal; HLA = antígeno leucocitário humano; PEPI = epítipo pessoal

[00293] Cada um dos peptídeos 30-mericos em PoliPEPI1018 foi liberado para desenvolvimento clínico, uma vez que nenhum dos 8-meros nas regiões de junção correspondia a qualquer proteína humana, exceto aos CTAs-alvo.

[00294] Caracterização da atividade/eficácia

[00295] Os inventores desenvolveram biomarcadores farmacodinâmicos para prever a atividade/efeito de vacinas em indivíduos humanos individuais, assim como em populações de indivíduos humanos. Estes biomarcadores agilizam o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e também diminuem o custo de desenvolvimento. Os inventores têm as seguintes ferramentas:

[00296] Base de conhecimento de expressão de antígenos: Os inventores coletaram dados de experimentos publicados em revistas científicas revisadas por pares quanto aos antígenos tumorais expressos por células tumorais e organizados por tipo de tumor para criar uma base de dados de níveis de expressão de CTA - base de dados de CTA (CTADB). Em abril de 2017, a CTADB continha dados de 145 CTAs de 41.132 amostras tumorais e foi organizada pelas frequências de expressão de CTA em diferentes tipos de câncer.

[00297] Populações de ensaios in silico: Os inventores também coletaram dados quanto aos genótipos HLA de várias

populações modelo diferentes. Cada indivíduo nas populações tem dados completos do genótipo de HLA com quatro dígitos e de etnia. As populações estão sumarizadas na Tabela 33.

Tabela 33 Populações de ensaios in silico

<b>População</b>	<b>Número de Indivíduos</b>	<b>Critérios de inclusão</b>
População Modelo	433	Genótipo completo de HLA de classe I Etnia diversa
Pacientes com CRC	37	Genótipo completo de HLA de classe I Diagnóstico de CRC, etnia desconhecida
"Grande" População	7.189	Genótipo completo de HLA de classe I Etnia diversa
População chinesa	234	Genótipo completo de HLA de classe I Etnia chinesa
População irlandesa	999	Genótipo completo de HLA de classe I Etnia irlandesa

Abreviações: CRC = câncer colorretal; HLA = antígeno leucocitário humano

[00298] Usando-se estas ferramentas (ou bases de dados ou populações modelo potencialmente equivalentes), podem ser avaliados os seguintes marcadores:

[00299] AG95 - potência de uma vacina: O número de antígenos em uma vacina contra câncer que um tipo específico de tumor expressa com 95% de probabilidade. O AG95 é um indicador da potência da vacina e é independente da imunogenicidade dos antígenos da vacina. O AG95 é calculado a

partir dos dados da taxa de expressão do antígeno tumoral, coletados na CTADB. Tecnicamente, o AG95 é determinado a partir da distribuição binomial dos CTAs e leva em consideração todas as possíveis variações e taxas de expressão. Neste estudo, o AG95 foi calculado cumulando-se as probabilidades de um certo número de antígenos expressos, pelo maior intervalo de antígenos em que a soma das probabilidades fosse menor ou igual a 95%. O valor correto está entre 0 (nenhuma expressão esperada com 95% de probabilidade) e o número máximo de antígenos (todos os antígenos expressos com 95% de probabilidade).

[00300] Contagem de PEPI3+ - imunogenicidade de uma vacina em um indivíduo: O PEPI3 + derivado da vacina é epítopo pessoal que induz respostas de células T em um indivíduo. Os PEPI3+ podem ser determinados usando-se o Teste PEPI3+ em indivíduos cujo genótipo HLA completo de 4 dígitos seja conhecido.

[00301] Contagem de AP - antigenicidade de uma vacina em um indivíduo: Número de antígenos da vacina com PEPI3+. Vacinas como PoliPEPI1018 contêm sequências de antígenos expressos em células tumorais. A contagem de AP é o número de antígenos na vacina que contêm PEPI3+ e a contagem de AP representa o número de antígenos na vacina que podem induzir respostas de células T em um indivíduo. A contagem de AP

caracteriza as respostas de células T específicas para os antígenos da vacina do indivíduo, uma vez ela que depende apenas do genótipo de HLA do indivíduo e é independente da doença, idade e medicação do indivíduo. O valor correto está entre 0 (nenhum PEPI apresentado pelo antígeno) e o número máximo de antígenos (todos os antígenos apresentam PEPIs).

[00302] AP50 - antigenicidade de uma vacina em um população: O número médio de antígenos da vacina com um PEPI em uma população. O AP50 é adequado para a caracterização de respostas de células T específicas para os antígenos da vacina em uma dada população, uma vez que depende do genótipo de HLA dos indivíduos em uma população. Tecnicamente, a contagem de AP foi calculada na População Modelo e a distribuição binomial do resultado foi usada para se calcular o AP50.

[00303] Contagem de AGP - efetividade de uma vacina em um indivíduo: Número de antígenos da vacina expressos no tumor com PEPI. A contagem de AGP indica o número de antígenos tumorais que a vacina reconhece e contra os quais induz uma resposta de células T (atingindo o alvo). A contagem de AGP depende da taxa de expressão de antígenos da vacina no tumor do indivíduo e no genótipo de HLA do indivíduo. O valor correto está entre 0 (nenhum PEPI apresentado pelo antígeno expresso) e o número máximo de antígenos (todos os antígenos são



expressos e apresentam um PEPI).

[00304] AGP50 - efetividade de uma vacina contra câncer em um população: O número médio de antígenos da vacina expresso no tumor indicado com PEPI (isto é, AGP) em uma população. O AGP50 indica o número médio de antígenos tumorais que as respostas de células T induzidas pela vacina podem reconhecer. O AGP50 depende da taxa de expressão dos antígenos no tipo de tumor indicado e da imunogenicidade dos antígenos na população-alvo. O AGP50 pode estimar a efetividade de uma vacina em diferentes populações e pode ser usado para comparar diferentes vacinas na mesma população. O cálculo do AGP50 é similar ao usado para o AG50, à exceção de que a expressão é ponderada pela ocorrência de PEPI3+ no indivíduo nos antígenos expressos da vacina. Em uma população teórica, na qual cada indivíduo tem um PEPI de cada antígeno da vacina, o AGP50 será igual a AG50. Em uma outra população teórica, na qual nenhum indivíduo tem um PEPI de qualquer antígeno da vacina, o AGP50 será 0. Em geral, é válida a seguinte declaração:  $0 \leq \text{AGP50} \leq \text{AG50}$ .

[00305] mAGP - um biomarcador candidato para a seleção de prováveis respondedores: A probabilidade de uma vacina contra câncer induzir respostas de células T contra múltiplos antígenos expressos no tumor indicado. O mAGP é calculado a partir das taxas de expressão de antígenos da vacina em CRC e

da presença de PEPIs derivados da vacina no indivíduo. Tecnicamente, com base na distribuição de AGP, o mAGP é a soma das probabilidades de múltiplos AGP ( $\geq 2$  AGPs).

[00306] Aplicação destes marcadores para avaliar a antigenicidade e a efetividade de PoliPEPI1018 em Pacientes Individuais com CRC

[00307] A Tabela 34 mostra a antigenicidade e a efetividade de PoliPEPI1018 em 37 pacientes com CRC usando-se AP e AGP50, respectivamente. Como esperado a partir da alta variabilidade das respostas de células T específicas para PoliPEPI1018 (vide Tabela 29), o AP e o AGP50 têm alta variabilidade. O antígeno mais imunogênico em PoliPEPI1018 foi FOXO39; cada paciente teve um PEPI3+. No entanto, o FOXO39 é expresso em apenas 39% dos tumores de CRC, sugerindo que 61% dos pacientes terão respostas de células T específicas a FOXO39 que não reconhecem o tumor. O antígeno menos imunogênico foi MAGE-A8; nenhum dos 37 pacientes com CRC apresentou PEPI3+, apesar de o antígeno ser expresso em 44% dos tumores de CCR. Estes resultados ilustram que tanto a expressão quanto a imunogenicidade de antígenos podem ser levadas em consideração ao se determinar a efetividade de uma vacina contra câncer.

[00308] O AGP50 indica o número médio de antígenos expressos no tumor de CRC com PEPIs. Pacientes com valores mais

altos de AGP50 têm maior probabilidade de responderem a PoliPEPI1018, pois valores mais altos de AGP50 indicam que a vacina pode induzir respostas de células T contra mais antígenos expressos em células de CRC.

[00309] A última coluna na Tabela 32 mostra a probabilidade de mAGP (múltiplos AGP; isto é, pelo menos 2 AGPs) em cada um dos 37 pacientes com CRC. O mAGP médio em pacientes com CRC é de 66%, sugerindo que há uma probabilidade de 66% de um paciente com CRC induzir respostas de células T contra múltiplos antígenos expressos no tumor.

[00310] Tabela 34 - Antigenicidade (contagem de AP), Efetividade (contagem de AGP50), e mAGP de PoliPEPI1018 em 37 pacientes com CRC

Antígenos (CTAs) em PoliPEPI1018	TSP50	EpCAM	Survivina	CAGE1	SPAG9	FBXO39	MAGE-A8	Número de AP (contagem de AP)	Número de AGP50 (contagem de AGP50)	mAGP
Taxa de expressão	89%	88%	87%	74%	74%	39%	44%			
Pacientes com CRC										
CRC-01	0	0	0	1	1	1	0	3	1,87	90%
CRC-02	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	85%
CRC-03	1	1	0	1	0	1	0	4	2,91	97%
CRC-04	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	91%
CRC-05	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	78%
CRC-06	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	99%
CRC-07	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	84%
CRC-08	0	1	1	1	0	1	0	4	2,89	98%
CRC-09	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	99%
CRC-10	1	0	0	0	0	1	0	2	1,28	86%
CRC-11	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	79%
CRC-12	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	88%
CRC-13	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	98%
CRC-14	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	87%
CRC-15	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	90%
CRC-16	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	85%

CRC-17	1	1	1	0	0	1	0	4	3,04	96%
CRC-18	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	98%
CRC-19	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	85%
CRC-20	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	98%
CRC-21	0	1	0	1	0	1	0	3	2,01	93%
CRC-22	1	1	0	1	0	1	0	4	2,91	97%
CRC-23	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	99%
CRC-24	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	82%
CRC-25	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	89%
CRC-26	1	1	0	1	0	1	0	4	2,91	95%
CRC-27	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	78%
CRC-28	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	98%
CRC-29	1	0	0	1	0	1	0	3	2,03	92%
CRC-30	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	98%
CRC-31	1	0	0	0	0	1	0	2	1,28	80%
CRC-32	1	0	1	0	0	1	0	3	2,15	91%
CRC-33	1	1	1	1	0	1	0	5	3,78	98%
CRC-34	0	0	0	1	0	1	0	2	1,13	82%
CRC-35	0	0	0	0	0	1	0	1	0,39	55%
CRC-36	0	0	0	0	0	1	0	1	0,39	55%
CRC-37	0	0	0	0	0	1	0	1	0,39	55%

Abreviações: CRC = câncer colorretal; PEPI = epítipo pessoal; CTA = antígenos de câncer/testículo; AP = antígenos expressos com PEPI  $\geq 1$

[00311] Estes biomarcadores têm utilidade imediata no desenvolvimento de vacinas e na prática clínica de rotina, pois não requerem biópsias invasivas. Os dados de expressão de antígenos podem ser obtidos a partir de amostras de tumores e organizados em bases de dados. A genotipagem de HLA com quatro dígitos pode ser realizada a partir de uma amostra de saliva. É um teste validado realizado por laboratórios certificados em todo o mundo para transplante e testes de paternidade. Estas avaliações permitirão que desenvolvedores de fármacos e médicos obtenham insights mais profundos quanto à imunogenicidade e à atividade de resposta tumoral e quanto ao possível surgimento

de resistência.

[00312] Aplicação destes marcadores para avaliar a antigenicidade e a efetividade de PoliPEPI1018 em populações

[00313] Antigenicidade da vacina PoliPEPI1018 CRC em uma população geral

[00314] A antigenicidade de PoliPEPI1018 em um indivíduo é determinada pela contagem de AP, que indica o número de antígenos da vacina que induzem respostas de células T em um indivíduo. A contagem de AP de PoliPEPI1018 foi determinada em cada um dos 433 indivíduos na População Modelo usando-se o Teste PEPI e a contagem de AP50 foi, então, calculada para a População Modelo.

[00315] Conforme mostrado na Figura 20, o AP50 de PoliPEPI1018 na população modelo de é 3,62. Portanto, o número médio de antígenos imunogênicos (isto é, antígenos com PEPI  $\geq 1$ ) em PoliPEPI1018 em uma população geral é de 3,62.

[00316] Efetividade da vacina PoliPEPI1018 contra CRC em uma população geral

[00317] As células T induzidas por vacina podem reconhecer e matar células tumorais se um PEPI na vacina for apresentado pela célula tumoral. O número de AGPs (antígenos expressos com PEPI) é um indicador da efetividade da vacina em um indivíduo e depende tanto da potência e quanto da

antigenicidade de PoliPEPI1018. Conforme mostrado na Figura 21, o número médio de CTA imunogênicos (isto é, AP [antígenos expressos com PEPI  $\geq 1$ ]) em PoliPEPI1018 é de 2,54 na População Modelo.

[00318] A probabilidade de PoliPEPI1018 induzir respostas de células T contra múltiplos antígenos em um indivíduo (isto é, mAGP) na População Modelo é de 77%.

[00319] Comparação das atividades da vacina PoliPEPI1018 contra CRC em diferentes populações

[00320] As Tabelas 35 a 37 mostram a comparação da imunogenicidade, antigenicidade e efetividade de PoliPEPI1018 em diferentes populações.

[00321] Tabela 35 - Comparação de Imunogenicidade, Antigenicidade e Efetividade de PoliPEPI1018 em diferentes subpopulações

População	Número Indivíduo	Número de PEPI3+		Número de AP		Número de AGP50	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
CRC	37	5,16	1,98	3,19	1,31	2,21	1,13
Modelo	433	5,02	2,62	3,62	1,67	2,54	1,25
Grande	7,189	5,20	2,82	3,75	1,74	2,66	1,30
Chinesa	324	5,97	3,16	4,28	1,78	3,11	1,30
Irlandesa	999	3,72	1,92	2,86	1,46	1,94	1,10

Abreviações: CRC = câncer colorretal; PEPI = epítopo pessoal; DP = desvio padrão; AP = antígenos expressos com PEPI  $\geq 1$

[00322] O número médio de resultados de PEPI3+ e AP

demonstra que PoliPEPI1018 é altamente imunogênico e antigênico em todas as populações; PoliPEPI1018 pode induzir uma média de 3,7 - 6,0 clones de células T específicos para CRC contra 2,9 - 3,7 antígenos de CRC. A imunogenicidade de PolyPEPI1018 foi similar em pacientes com CCR e na população média ( $p>0,05$ ), essa similaridade pode ter sido por causa do pequeno tamanho da amostra da população com CRC. Análises adicionais sugerem que PoliPEPI1018 é significativamente mais imunogênico em uma população chinesa em comparação com uma população irlandesa ou geral ( $p<0,0001$ ). As diferenças na imunogenicidade também se refletem na efetividade da vacina, caracterizada por AGP50; PoliPEPI1018 é mais efetiva em uma população chinesa e menos efetiva em uma população irlandesa. Como será usado um CDx para selecionar prováveis respondedores a PolPEPI1018, as diferenças étnicas serão refletidas apenas na porcentagem mais alta de indivíduos chineses que poderiam ser elegíveis para tratamento em comparação com indivíduos irlandeses.

Tabela 36 - Vacina contra CRC PoliPEPI1018, Taxas de Resposta Imune Preditas Contra Múltiplos Antígenos de CRC

População		Nº Indivíduos	Respostas CTL MultiAG de PoliPEPI1018				
			≥3	≥4	≥5	≥6	7
Pacientes com CRC	Vietnamita	211	91%	81%	56%	38%	17%
	EUA	44	57%	34%	20%	5%	0%
	Caucasiana	83	75%	51%	30%	17%	4%
Doadores	EUA	400	61%	39%	25%	12%	3%

Normais	Europa	1.386	55%	30%	18%	7%	1%
	Chinesa	324	84%	68%	45%	26%	15%
	Okinawa (JP)	104	81%	57%	36%	16%	13%
	Japonesa	45	77%	55%	34%	16%	13%

Tabela 37 - Vacina contra CRC PoliPEPI1018, Taxas de Resposta Imune Preditas Contra Múltiplos Antígenos de CRC

População		N° Indivíduos	Número de PEPI		Número de AP		Número de AGP50	
			Média	SD	Média	SD	Média	SD
Pacientes com CRC	Vietnamita	211	6,96	3,01	4,81	1,58	3,47	1,16
	EUA	44	4,05	2,05	3,00	1,46	2,05	1,12
	Caucasiana	83	4,75	2,39	3,57	1,76	2,50	1,27
Doadores Normais	EUA	400	4,30	2,50	3,19	1,74	2,17	1,30
	Europa	1.386	3,84	2,01	2,94	1,51	2,00	1,14
	Chinesa	324	5,97	3,16	4,28	1,78	3,11	1,30
	Okinawa (JP)	104	5,29	2,58	4,01	1,63	2,91	1,19
	Japonesa	45	5,31	3,27	3,67	1,77	2,66	1,29

[00323] Exemplo 21 - Composição de Imunoterapia Personalizada para Tratamento de Câncer de Ovário

[00324] Este exemplo descreve o tratamento de uma paciente com câncer de ovário com uma composição de imunoterapia personalizada, em que a composição foi desenhada especificamente para a paciente com base em seu genótipo de HLA com base na divulgação aqui descrita. Este Exemplo e o Exemplo 22 abaixo fornecem dados clínicos para apoiar os



princípios relativos à ligação de epítomos por múltiplos HLA de um indivíduo para induzir uma resposta de células T citotóxicas na qual a presente divulgação se baseia.

[00325] O genótipo de HLA de classe I e da classe II da paciente com câncer adenocarcinoma de ovário metastático XYZ foi determinado a partir de uma amostra de saliva.

[00326] Para fazer uma composição farmacêutica personalizada para a paciente XYZ, foram selecionados treze peptídeos, cada um dos quais atendeu aos dois critérios a seguir: (i) derivados de um antígeno que é expresso em câncer de ovário, conforme relatado em publicações científicas revisadas por pares; e (ii) compreendem um fragmento que é um epítomo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I da paciente XYZ (Tabela 38). Além disso, cada peptídeo é otimizado de modo a se ligar ao número máximo de HLA de classe II da paciente.

Tabela 38: Vacina personalizada da paciente XYZ com câncer de ovário

Vacina de XYZ	Antígeno-Alvo	Antígeno Expressão	Peptídeos 20-méricos	MAX HLA classI	MAX HLA classII
POC01_P1	AKAP4	89%	NSLQKQLQAVLQWIAASQFN	3	5
POC01_P2	BORIS	82%	SGDERSDEIVLTVSNSNVEE	4	2
POC01_P3	SPAG9	76%	VQKEDGRVQAFGWSLPQKYK	3	3
POC01_P4	OY-TES-1	75%	EVESTPMIMENIQELIRSAQ	3	4
POC01_P5	SP17	69%	AYFESLLEKREKTNFDPAEW	3	1

POC01_P6	WT1	63%	PSQASSGQARMFPNAPYLPS	4	1
POC01_P7	HIWI	63%	RRSIAGFVASINEGMTRWFS	3	4
POC01_P8	PRAME	60%	MQDIKMILKMVQLDSIEDLE	3	4
POC01_P9	AKAP-3	58%	ANSVVSDMMVSIMKTLKIQV	3	4
POC01_P10	MAGE-A4	37%	REALSNKVDELAHFLLRKYR	3	2
POC01_P11	MAGE-A9	37%	ETSYEKVINYLVMNLNAREPI	3	4
POC01_P12a	MAGE-A10	52%	DVKEVDPTGHSFVLVTSLGL	3	4
POC01_P12b	BAGE	30%	SAQLLQARLMKEESPVVSWR	3	2

[00327] Onze peptídeos PEPI3 nesta composição de imunoterapia podem induzir respostas de células T em XYZ com probabilidade de 84% e os dois peptídeos PEPI4 (POC01-P2 e POC01-P5), com 98% de probabilidade, de acordo com a validação do Teste de PEPI mostrado na Tabela 3. As respostas de células T têm como alvo 13 antígenos expressos em cânceres de ovário. A expressão destes antígenos de câncer na paciente XYZ não foi testada. Em vez disso, a probabilidade de sucesso em matar células cancerígenas foi determinada com base na probabilidade de expressão de antígenos nas células cancerígenas da paciente e no valor preditivo positivo do Teste PEPI3+  $\geq 1$  (contagem de AGP). A contagem de AGP prediz a efetividade de uma vacina em um indivíduo: Número de antígenos da vacina expressos no tumor da paciente (adenocarcinoma de ovário) com PEPI. A contagem de AGP indica o número de antígenos tumorais que a vacina reconhece e contra os quais induz uma resposta das células T contra o tumor da paciente (atingindo o alvo). A contagem de AGP depende da taxa de expressão de antígenos da vacina no

tumor do indivíduo e no genótipo de HLA do indivíduo. O valor correto deve estar entre 0 (nenhum PEPI apresentado pelo antígeno expresso) e o número máximo de antígenos (todos os antígenos são expressos e apresentam PEPI).

[00328] A probabilidade de a paciente XYZ expressar um ou mais dos 12 antígenos é mostrada na Fig. 22. AGP95 = 5, AGP50 = 7,9, mAGP = 100%, AP = 13.

[00329] Uma composição farmacêutica para a paciente XYZ pode ser composta de pelo menos 2 dos 13 peptídeos (Tabela 38), pois a presença em uma composição de vacina ou de imunoterapia de pelo menos dois fragmentos de polipeptídeos (epítomos) que podem se ligar a pelo menos três HLA de um indivíduo (PEPI3+  $\geq 2$ ) foi determinada como sendo preditiva de uma resposta clínica. Os peptídeos são sintetizados, dissolvidos em um solvente farmacêuticamente aceitável e misturados com um adjuvante antes da injeção. É desejável que o paciente receba imunoterapia personalizada com pelo menos duas vacinas peptídicas, mas é mais preferível aumentar a probabilidade de matar células cancerígenas e diminuir a chance de recaída.

[00330] Para o tratamento da paciente XYZ, os 12 peptídeos foram formulados como 4 x 3/4 de peptídeo (POC01/1, POC01/2, POC01/3, POC01/4). Um ciclo de tratamento é definido como a administração de todos os 13 peptídeos dentro de 30

dias.

[00331] Histórico da paciente:

[00332] Diagnóstico: Adenocarcinoma ovariano  
metastático

[00333] Idade: 51

[00334] Anamnese da família: câncer de cólon e ovário  
(mãe), câncer de mama (avó)

[00335] Patologia do tumor:

[00336] BRCA1-185delAG, BRAF-D594Y, MAP2K1-P293S,  
NOTCH1-S2450N

[00337] 2011: primeiro diagnóstico de adenocarcinoma de  
ovário; operação de Wertheim e quimioterapia; remoção de  
linfonodos

[00338] 2015: metástase no tecido adiposo pericárdico,  
excisada

[00339] 2016: metástases hepáticas

[00340] 2017: linfonodos retroperitoneais e  
mesentéricos progrediram; carcinose peritoneal incipiente com  
pequenas ascites acompanhantes

[00341] Terapia Anterior:

[00342] 2012: Paclitaxel-carboplatina (6x)

[00343] 2014: Caelyx-carboplatina (1x)

[00344] 2016-2017 (9 meses): Lymparza (Olaparib) 2x400

mg/dia, oral

[00345] 2017: Inf. Hycamtin 5x2,5 mg (3x uma seria/mês)

[00346] O tratamento com a vacina PIT começou em 21 de abril de 2017.

[00347] Tabela 39 Cronograma de tratamento da paciente XYZ com peptídeos

Nº lote		Vacinações			
		1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo
POC01/1	N1727	21/04/2017	16/06/2017	30/08/2017	19/10/2017
POC01/2	N1728	28/04/2017	31/05/2017		
POC01/3	N1732		16/06/2017	02/08/2017	20/09/2017
POC01/4	N1736	15/05/2017	06/07/2017		

[00348] **Achados de imageamento por ressonância magnética do tumor da paciente (linha de base 15 de abril de 2016)**

- A doença estava confinada principalmente ao fígado e aos linfonodos. O uso de imageamento por ressonância magnética limita a detecção de metástases pulmonares

- Maio de 2016 - Jan de 2017: Tratamento com olaparibe
- 25/12/2016 (antes do tratamento com a vacina PIT)

Houve drástica redução da carga tumoral com confirmação da resposta obtida em FU2

- Jan - Mar de 2017 - protocolo TOPO (topoisomerase)
- FU3 de 6/abril/2017 demonstrou novo crescimento das lesões existentes e aparecimento de novas lesões levando à

progressão da doença

- **21 de abril de 2017 INICIAR PIT**
- FU4 de 21/jul/17 (após o 2º Ciclo de PIT) demonstrou crescimento continuado das lesões e aumento geral do pâncreas e sinal para-pancreático anormal juntamente com ascites aumentadas
- 26/jul/17 - CBP+Gem+Avastin
- FU5 de 20/set/17 (após 3 Ciclos de PIT) demonstrou reversão do crescimento da lesão e melhora do sinal pancreático/parapancreático. Os achados sugerem pseudo progressão
- FU6 28/nov/17 (após 4 Ciclos de PIT) demonstrou a melhor resposta com resolução de lesões-não alvo

[00349] Os dados de imageamento por ressonância magnética para a paciente XYZ são mostrados na Tabela 40 e na Figura 23.

Tabela 40. Tabela Resumo das Respostas das Lesões

Lesão/Momento no Tempo	Linha Base (%Δ em relação à LB)	FU1 (%Δ em relação à LB)	FU2 (%Δ em relação à LB)	FU3 (%Δ em relação à LB)	FU4 (%Δ em relação à LB)	FU5 (%Δ em relação à LB)	FU6 (%Δ em relação à LB)	Ciclo da Melhor Resposta	Momento no Tempo de DP
TL1	NA	-56,1	-44,4	-44,8	+109,3	-47,8	-67,3	FU6	FU4
TL2	NA	100,0	100,0	-47,1	-13,1	100,0	-100,0	FU1	FU3
TL3	NA	-59,4	-62,3	-62,0	-30,9	-66,7	-75,9	FU6	FU4
TL4	NA	-65,8	100,0	100,0	100,0	100,0	-100,0	FU2	NA
SUM	NA	-66,3	-76,0	-68,9	-23,5	-78,2	-85,2	FU6	FU4

[00350] Exemplo 22 Desenho de Composição de

### Imunoterapia Personalizada para Tratamento de Câncer de Mama

[00351] O genótipo de HLA de classe I e da classe II da paciente ABC com câncer de mama metastático foi determinado a partir de uma amostra de saliva. Para se fazer uma composição farmacêutica personalizada para a paciente ABC, foram selecionados doze peptídeos, cada um dos quais atendeu aos dois critérios a seguir: (i) derivados de um antígeno que é expresso em câncer de ovário, conforme relatado em publicações científicas revisadas por pares; e (ii) compreendem um fragmento que é um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA de classe I da paciente ABC (Tabela 41). Além disso, cada peptídeo é otimizado de modo a se ligar ao número máximo de HLA de classe II da paciente. Os doze peptídeos têm como alvo doze antígenos de câncer de mama. A probabilidade de a paciente ABC expressar um ou mais dos 12 antígenos é mostrada na Fig. 24.

Tabela 41. 12 peptídeos para a paciente ABC com câncer de mama

Peptídeos da vacina BRC09	Antígeno-Alvo	Expressão de Antígenos	Peptídeo 20-mérico	MAXHLA Classe I	MAXHLA Classe II
PBRC01_cp1	FSIP1	49%	ISDTKDYFMSKTLGIGRLKR	3	6
PBRC01_cp2	SPAG9	88%	FDRNTESLFEELSSAGSGLI	3	2
PBRC01_cp3	AKAP4	85%	SQKMDMSNIVLMLIQKLLNE	3	6
PBRC01_cp4	BORIS	71%	SAVFHERYALIQHQKTHKNE	3	6
PBRC01_cp5	MAGE-A11	59%	DVKEVDPTSHSYVLVTSNLN	3	4

PBRC01_cp6	NY-SAR-35	49%	ENAHGQSLEEDSALEALLNF	3	2
PBRC01_cp7	HOM-TES-85	47%	MASFRKLTLEKVPNNHPSR	3	5
PBRC01_cp8	NY-BR-1	47%	KRASQYSGQLKVLIAENTML	3	6
PBRC01_cp9	MAGE-A9	44%	VDPAQLEFMFQEALKLKVAE	3	8
PBRC01_cp10	SCP-1	38%	EYEREETRQVYMDLNNNIEK	3	3
PBRC01_cp11	MAGE-A1	37%	PEIFGKASESLQLVFGIDVK	3	3
PBRC01_cp12	MAGE-C2	21%	DSESSFTYTLDEKVAELVEF	4	2

[00352] Eficácia predita: AGP95=4; 95% de probabilidade de a Vacina PIT induzir respostas de CTL contra 4 CTAs expressos nas células de câncer de mama de BRC09. Parâmetros de eficácia adicionais: AGP50 = 6,3 , mAGP = 100%, AP = 12.

[00353] Eficácia detectada após a 1ª vacinação com todos os 12 peptídeos: Redução de 83% da atividade metabólica do tumor (dados de PET CT).

[00354] Para o tratamento da paciente ABC, os 12 peptídeos foram formulados como peptídeo 4 x 3 (PBR01/1, PBR01/2, PBR01/3, PBR01/4). Um ciclo de tratamento é definido como sendo a administração de todas as 12 vacinas peptídicas diferentes dentro de 30 dias.

[00355] Histórico da paciente:

[00356] Diagnóstico: carcinoma de mama metastático bilateral: A mama direita é ER positiva, PR negativa, Her2 negativa; a mama esquerda é ER, PR e Her2 negativos.

[00357] Primeiro diagnóstico: 2013 (4 anos antes do tratamento com a vacina PIT)



[00358] 2016: doença metastática extensa com envolvimento nodal tanto acima quanto abaixo do diafragma. Múltiplas metástases hepáticas e pulmonares.

[00359] Tratamento em 6-2017: Etrazol, Ibrance (Palbociclib) e Zoladex

[00360] Resultados

[00361] 7 de março de 2017: Tratamento prévio com a vacina PIT

[00362] Doença multimetastática hepática com compressão verdadeiramente extrínseca da origem do ducto colédoco e dilatação maciça de todo o trato biliar intra-hepático. Adenopatia celíaca, hilar hepática e retroperitoneal

[00363] 26 de maio de 2017: Após 1 ciclo de PIT

[00364] Eficácia detectada: Redução de 83% da atividade metabólica do tumor (PET CT), metástase no fígado, linfonodos pulmonares e outras metástases

[00365] Segurança detectada: Reações cutâneas

[00366] Inflamação local no local das injeções dentro de 48 horas após a administração da vacina

[00367] Acompanhamento:

[00368] BRC-09 foi tratada com 5 ciclos de vacina PIT. Ela estava se sentindo muito bem e recusou um exame de PET CT em setembro de 2017. Em novembro, ela teve sintomas, o PET CT

mostrou doença progressiva, mas ela recusou todos os tratamentos. Além disso, seu oncologista descobriu que ela tomava Palbociclib desde a primavera/verão. A paciente ABC faleceu em janeiro de 2018.

[00369] A combinação de pablocicliclib e da vacina personalizada provavelmente foi responsável pela notável resposta precoce observada após a administração da vacina. O palbocicliclib demonstrou melhorar a atividade das imunoterapias, aumentando a apresentação de CTA por HLAs e diminuindo a proliferação de Tregs: (Goel et al. Nature. 2017:471-475). A vacina PIT pode ser usada como complemento da terapia de última geração para se obter eficácia máxima.

[00370] Exemplo 23 - Composição de Imunoterapia Personalizada para tratamento de pacientes com câncer de mama metastático em estágio tardio A paciente BRC05 foi diagnosticada com câncer de mama inflamatório à direita com carcinomatose linfangiose extensa. Câncer de mama inflamatório (CMI) é uma forma rara, mas agressiva, de câncer de mama localmente avançada. É denominado câncer de mama inflamatório porque seus principais sintomas são inchaço e vermelhidão (a mama parece frequentemente inflamada). A maioria dos cânceres de mama inflamatórios são carcinomas ductais invasivos (que começam nos dutos de leite). Este tipo de câncer de mama está

associado à expressão de oncoproteínas do Vírus do Papiloma Humano de alto risco. De fato, o DNA do HPV16 foi diagnosticado no tumor desta paciente.

[00371] Estágio da paciente em 2011 (6 anos antes do tratamento da vacina PIT)

[00372] T4: Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica e/ou à pele (ulceração ou nódulos cutâneos)

[00373] pN3a: Metástases em  $\geq 10$  linfonodos axilares (pelo menos 1 depósito tumoral  $> 2,0$  mm); ou metástases para os linfonodos infraclaviculares (linfonodos axilares de nível III).

[00374] 14 peptídeos de vacina foram desenhados e preparados para a paciente BRC05 (Tabela 42). Os peptídeos PBRC05-P01-P10 foram feitos para esta paciente com base em dados de expressão populacional. Os últimos 3 peptídeos na Tabela 42 (SSX-2, MORC, MAGE-B1) foram desenhados a partir de antígenos cuja expressão foi medida diretamente no tumor da paciente.

Tabela 42 - Peptídeos da vacina para a paciente BRC05

Peptídeos da vacina BRC05	Antígeno-Alvo	Expressão de Antígenos	Peptídeo 20-mérico	MAXHLA Classe I	MAXHLA Classe II
PBRC05_P1	SPAG9	88%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	4
PBRC05_P2	AKAP4	85%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	4

PBRC05_P3	MAGE-A11	59%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3
PBRC05_P4	NY-SAR-35	49%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3
PBRC05_P5	FSIP1	49%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3
PBRC05_P6	NY-BR-1	47%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	4
PBRC05_P7	MAGE-A9	44%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3
PBRC05_P8	SCP-1	38%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	6
PBRC05_P9	MAGE-A1	37%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3
PBRC05_P10	MAGE-C2	21%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3
PBRC05_P11	MAGE-A12	13%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	4
PBRC05_P12	SSX-2	6%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	1
PBRC05_P13	MORC	ND	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	4
PBRC05_P14	MAGE-B1	ND	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	3	3

Nota: Negrito vermelho significa PEPI CD8, sublinhado significa o melhor alelo de ligação de CD4.

[00375] As respostas das células T foram medidas em células mononucleares periféricas 2 semanas após a 1ª vacinação com a mistura de peptídeos PBRC05\_P1, PBRC05\_P2, PBRC05\_P3, PBRC05\_P4, PBRC05\_P5, PBRC05\_P6, PBRC05\_P7.

Tabela 43 - Respostas de células T específicas para antígenos: Número de manchas ("spots") / 300.000 PBMC

Antígeno	Estimulante	Exp1	Exp2	Média
SPAG9	PBRC05_P1	2	1	1,5
AKAP4	PBRC05_P2	11	4	7,5
MAGE-A11	PBRC05_P3	26	32	29
NY-SAR-35	PBRC05_P4	472	497	484,5
FSIP1	PBRC05_P5	317	321	319
NY-BR-1	PBRC05_P6	8	12	10
MAGE-A9	PBRC05_P7	23	27	25
Nenhum	Controle Negativo (DMSO)	0	3	1,5

[00376] Os resultados mostram que uma única imunização com 7 peptídeos induziu respostas potentes de células T contra

3 dos 7 peptídeos demonstrando respostas potentes de células T específicas para MAGE-A11, NY-SAR-35, FSIP1 e MAGE-A9. Houve respostas fracas contra AKAP4 e NY-BR-1 e nenhuma resposta contra SPAG9.

[00377] Referências

<sup>1</sup> Bagarazzi et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. Science Translational Medicine. 2012; 4(155):155ra138.

<sup>2</sup> Gudmundsdotter et al. Amplified antigen-specific immune responses in HIV-1 infected individuals in a double blind DNA immunization and therapy interruption trial. Vaccine. 2011; 29(33):5558-66.

<sup>3</sup> Bioley et al. HLA class I - associated immunodominance affects CTL responsiveness to an ESO recombinant protein tumor antigen vaccine. Clin Cancer Res. 2009; 15(1):299-306.

<sup>4</sup> Valmori et al. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104(21):8947-52.

<sup>5</sup> Yuan et al. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. Proc Natl Acad Sci U S A.

2011;108(40):16723-16728.

<sup>6</sup> Kakimi et al. A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *Int J Cancer*. 2011;129(12):2836-46.

<sup>7</sup> Wada et al. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother*. 2014;37(2):84-92.

<sup>8</sup> Welters et al. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14(1):178-87.

<sup>9</sup> Kenter et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*. 2009; 361(19):1838-47.

<sup>10</sup> Welters et al. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *PNAS*. 2010; 107(26):11895-9.

11

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/main.fcgi?cmd=init>  
The MHC database, NCBI (Accessed Mar 7, 2016).

<sup>12</sup> Karkada et al. Therapeutic vaccines and cancer: focus on DPX-0907. *Biologics*. 2014;8:27-38.

<sup>13</sup> Butts et al. Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6674-81.

<sup>14</sup> Yuan et al. Safety and immunogenicity of a human and mouse gp100 DNA vaccine in a phase I trial of patients with melanoma. *Cancer Immun*. 2009;9:5.

<sup>15</sup> Kovjazin et al. ImMucin: a novel therapeutic vaccine with promiscuous MHC binding for the treatment of MUC1-expressing tumors. *Vaccine*. 2011;29(29-30):4676-86.

<sup>16</sup> Cathcart et al. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:1037-1042.

<sup>17</sup> Chapuis et al. Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med*. 2013;5(174):174ra27.

<sup>18</sup> Keilholz et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*; 2009; 113(26):6541-8.

<sup>19</sup> Walter et al. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med*. 2012;18(8):1254-61.

<sup>20</sup> Phuphanich et al. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(1):125-35.

<sup>21</sup> Kantoff et al. Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(7):1099-105.

<sup>22</sup> Tagawa et al. Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma. *Cancer*. 2003;98(1):144-54.

<sup>23</sup> Slingluff et al. Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multipeptide melanoma vaccine. *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2924-32.

<sup>24</sup> Kaida et al. Phase 1 trial of Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine and gemcitabine combination therapy in patients with advanced pancreatic or biliary tract cancer. *J Immunother*. 2011;34(1):92-9.

<sup>25</sup> Fenoglio et al. A multi-peptide, dual-adjuvant telomerase vaccine (GX301) is highly immunogenic in patients with prostate and renal cancer. *Cancer Immunol Immunother*; 2013; 62:1041-1052.

<sup>26</sup> Krug et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8



T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*; 2010; 59(10):1467-79.

<sup>27</sup>Slingluff et al. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol*; 2003; 21(21):4016-26.

<sup>28</sup>Hodi et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*; 2010; 363(8):711-23.

<sup>29</sup> Carmon et al. Phase I/II study exploring ImMucin, a pan-major histocompatibility complex, anti-MUC1 signal peptide vaccine, in multiple myeloma patients. *Br J Hematol*. 2014; 169(1):44-56.

<sup>30</sup><http://www.merckgroup.com/en/media/extNewsDetail.html?newsId=EB4A46A2AC4A52E7C1257AD9001F3186&newsType=1> (Accessed Mar 28, 2016)

<sup>31</sup> Trimble et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2015; 386(10008):2078-88.

<sup>32</sup>Cusi et al. Phase I trial of thymidylate synthase poly epitope peptide (TSPP) vaccine in advanced cancer patients. Cancer Immunol Immunother; 2015; 64:1159-1173.

<sup>33</sup>Asahara et al. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer. J Transl Med; 2013;11:291.

<sup>34</sup>Yoshitake et al. Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. Clin Cancer Res; 2014;21(2):312-21.

<sup>35</sup>Okuno et al. Clinical Trial of a 7-Peptide Cocktail Vaccine with Oral Chemotherapy for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Anticancer Res; 2014; 34: 3045-305.

<sup>36</sup>Rapoport et al. Combination Immunotherapy after ASCT for Multiple Myeloma Using MAGE-A3/Poly-ICLC Immunizations Followed by Adoptive Transfer of Vaccine-Primed and Costimulated Autologous T Cells. Clin Cancer Res; 2014; 20(5): 1355-1365.

<sup>37</sup>Greenfield et al. A phase I dose-escalation clinical trial of a peptidebased human papillomavirus therapeutic vaccine with Candida skin test reagent as a novel vaccine adjuvant for treating women with biopsy-proven cervical intraepithelial neoplasia 2/3. Oncoimmunol; 2015; 4:10,

e1031439.

<sup>38</sup> Snyder et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. N Engl J Med. 2014; 371(23):2189-99.

<sup>39</sup> Van Allen et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. Science; 2015; 350:6257.

<sup>40</sup> Li et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. Blood; 2001; 98:3241-3248

<sup>41</sup> Takedatsu et al. Determination of Thrombopoietin-Derived Peptides Recognized by Both Cellular and Humoral Immunities in Healthy Donors and Patients with Thrombocytopenia. 2005; 23(7): 975-982

<sup>42</sup> Eisenhauer et al. New response evaluation criteria in solid tumors: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer; 2009; 45(2):228-47.

<sup>43</sup> Therasse et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst; 2000; 92:205-216.

<sup>44</sup> Tsuchida & Therasse. Response evaluation criteria in solid tumors (RECIST): New guidelines. Med Pediatr Oncol. 2001; 37:1-3.

<sup>45</sup> Durie et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*; 2006;20:1467-1473.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Polipeptídeo **caracterizado** pelo fato de que compreende um fragmento de até 50 aminoácidos consecutivos de

(a) um antígeno associado a câncer colorretal selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBX039, SURVIVIN, LEMD1, MAGE-A8, MAGE-A6 e MAGE-A3, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250;

(b) um antígeno associado a câncer de ovário selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVIN, e AKAP-3, em que o fragmento compreende a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272 a 301; e/ou

(c) um antígeno associado a câncer de mama selecionado dentre PIWIL-2, AKAP-4, EpCAM, BORIS, HIWI, SPAG9, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, PRAME, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, SURVIVIN, MAGE-A11, HOM-TES-85 e NY-ESO-1, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194;

opcionalmente, em que o fragmento é flanqueado no N- e/ou no C-terminal por aminoácidos adicionais que não fazem parte da sequência do antígeno associado a câncer de mama, ovário ou

colorretal.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo

a. é um fragmento de um antígeno associado a câncer colorretal selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVIN, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3 e LEMD1, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; ou

b. compreende ou consiste em dois ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer colorretal selecionados dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVIN, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3 e LEMD1, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250, em que, opcionalmente, os fragmentos se sobrepõem ou estão dispostos extremidade a extremidade no polipeptídeo; ou

c. é um fragmento de um antígeno associado a câncer de ovário selecionado dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVIN e AKAP-3, em que o fragmento compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID

NOs: 272 a 301; ou

d. compreende ou consiste em dois ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer de ovário selecionados dentre PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVIN e AKAP-3, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 272 a 301, em que, opcionalmente, os fragmentos se sobrepõem ou estão dispostos de extremidade a extremidade no polipeptídeo; ou

e. é um fragmento de um antígeno associado a câncer de mama selecionado dentre SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVIN, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-85, PIWIL-2, EpCAM, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, em que o fragmento compreende a sequência de aminoácidos a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194; ou

f. compreende ou consiste em dois ou mais fragmentos de um ou mais antígenos associados a câncer de mama selecionados dentre SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVIN, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-8, PIWIL-2, EpCAM, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2, em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194,

em que, opcionalmente, os fragmentos se sobrepõem ou estão dispostos de extremidade a extremidade no polipeptídeo.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo compreende ou consiste em fragmentos de pelo menos dois antígenos diferentes associados a câncer, em que os antígenos associados a câncer são selecionados dentre

(a) TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVIN, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3 e LEMD1;

(b) PIWIL-4, WT1, EpCAM, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, SPAG9, PRAME, HIWI, SURVIVIN e AKAP-3; e/ou

(c) SPAG9, AKAP-4, BORIS, NY-SAR-35, NY-BR-1, SURVIVIN, MAGE-A11, PRAME, MAGE-A9, HOM-TES-8, PIWIL-2, EpCAM, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, SP17, RHOXF-2;

em que cada fragmento compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; SEQ ID NOs: 272 a 301; e/ou SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194.

4. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que compreende ou consiste em uma ou mais sequências de aminoácidos selecionadas a partir das SEQ ID NOs: 41-80, 251 a 271, 302 a 331 e 196 a 233.



5. Polipetídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 81 a 142, 332 a 346 e 435-449.

6. Painel de dois ou mais polipeptídeos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 **caracterizado** pelo fato de que

(a) cada polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; ou

(b) cada polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 272 a 301; ou

(c) cada peptídeo compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194; ou (c) cada peptídeo compreende uma sequência de aminoácidos diferente selecionada a partir das SEQ ID NOs: 1 a 40, 234 a 250, 272 a 301 e 172 a 194.

7. Painel de polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que compreende seis peptídeos tendo as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 130, 121, 131, 124, 134, 126.

8. Composição farmacêutica ou kit tendo um ou mais

polipeptídeos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou um painel de polipeptídeos, de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7, ou um polipeptídeo, **caracterizado(a)** pelo fato de que compreende pelo menos duas sequências de aminoácidos selecionadas de SEQ ID NOs: 21 a 40 e 234 a 250; SEQ ID NOs: 272 a 301; e/ou SEQ ID NOs: 1 a 20, 24 e 172 a 194 como ingrediente ativo.

9. Método de vacinação **caracterizado** pelo fato de que proporciona imunoterapia ou induz uma resposta de células T citotóxicas em um indivíduo, compreendendo o método administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 8.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que é um método para tratamento de câncer, opcionalmente câncer colorretal, câncer de ovário ou câncer de mama.

11. Método para identificar um indivíduo humano que provavelmente terá uma resposta de células T citotóxicas à administração de uma composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 8 **caracterizado** pelo fato de que o método compreende

(i) Determinar que o(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica

compreende(m) uma sequência que é um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA da classe I do indivíduo; e

(ii) identificar que o indivíduo provavelmente tenha uma resposta de células T citotóxicas à administração da composição farmacêutica.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente o uso de dados de expressão em uma população para cada antígeno que

(a) é selecionado dentre TSP50, EpCAM, SPAG9, CAGE1, FBXO39, SURVIVIN, LEMD1, MAGE-A8, MAGE-A6, MAGE-A3, PIWIL-4, WT1, BORIS, AKAP-4, OY-TES-1, SP17, PIWIL-2, PIWIL-3, PRAME, HIWI, PLU-1, TSGA10, ODF-4, RHOXF-2, NY-SAR-35, MAGE-A9, NY-BR-1, MAGE-A11, HOM-TES-85, NY-ESO-1 e AKAP-3; e

(b) compreende uma sequência de aminoácidos que é

i. um fragmento de um peptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica; e

ii. um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA da classe I do indivíduo;

determinar a probabilidade de o indivíduo ter uma resposta de células T citotóxicas que tenha como alvo um ou mais antígenos polipeptídicos que são expressos por células

cancerosas do indivíduo.

13. Método para identificar um indivíduo que provavelmente terá uma resposta de clínicas a um método de tratamento conforme definido na reivindicação 10 **caracterizado** pelo fato de que o método compreende

(i) determinar que o(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica compreende(m) duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada uma das quais é

a. um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA da classe I do indivíduo; e

b. um fragmento de um antígeno associado a câncer expresso por células cancerosas do indivíduo, em que, opcionalmente, o antígeno associado a câncer está presente em uma amostra obtida do indivíduo; e

(ii) identificar o indivíduo como tendo probabilidade de ter uma resposta clínica ao método de tratamento.

14. Método para determinar a probabilidade de um indivíduo humano específico ter uma resposta clínica a um método de tratamento conforme definido na reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que um ou mais dos seguintes fatores correspondem a uma maior probabilidade de uma resposta clínica:

(a) presença no(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) de um maior número de sequências de aminoácidos e/ou sequências de aminoácidos diferentes que são, cada uma, um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA da classe I do indivíduo;

(b) um maior número de antígenos polipeptídicos-alvo, compreendendo pelo menos uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA da classe I do indivíduo;

em que, opcionalmente, os antígenos polipeptídicos-alvo são expressos no indivíduo, em que, opcionalmente, os antígenos polipeptídicos-alvo adicionalmente estão em uma ou mais amostras obtidas do indivíduo;

(c) uma maior probabilidade de que o indivíduo expresse antígenos polipeptídicos-alvo, opcionalmente um número limite dos antígenos polipeptídicos alvo e/ou opcionalmente antígenos polipeptídicos-alvo que se determinou que compreendam pelo menos uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítopo de células T que tem a capacidade de

se ligar a pelo menos três HLA da classe I do indivíduo;

e/ou

(d) um maior número de antígenos polipeptídicos-alvo que se prediga que o indivíduo expresse, opcionalmente, um maior número de antígenos polipeptídicos-alvo que o indivíduo expresse com uma probabilidade limite, e/ou opcionalmente os antígenos polipeptídicos-alvo que se determinou que compreendem pelo menos uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA da classe I do indivíduo.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende

(i) identificar quais antígenos polipeptídicos que são alvo do(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) compreendem uma sequência de aminoácidos que tanto

A. esteja compreendida em um polipeptídeo do(s) ingrediente(s) ativo(s); quanto

B. seja um epítipo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três HLA da classe I do indivíduo;

(ii) usar dados de expressão na população para cada antígeno identificado na etapa (i) de modo a determinar a

probabilidade de o indivíduo expressar um ou mais dos antígenos identificados na etapa (i) que, em conjunto, compreendem pelo menos duas sequências de aminoácidos diferentes da etapa (i); e

(iii) determinar a probabilidade de que o indivíduo tenha uma resposta clínica à administração da composição farmacêutica, kit ou painel de polipeptídeos, em que uma maior probabilidade determinada na etapa (ii) corresponde a uma resposta clínica mais provável.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que as pelo menos duas sequências de aminoácidos diferentes estão compreendidas na sequência de aminoácidos de dois antígenos polipeptídicos diferentes que são alvo do(s) polipeptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s).

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente selecionar ou recomendar a administração da composição farmacêutica como um método de tratamento para o indivíduo e, opcionalmente, o tratamento adicional do indivíduo administrando-se a composição farmacêutica.

18. Método de tratamento, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que se identificou que o indivíduo provavelmente terá uma resposta clínica ou que tem

uma probabilidade mínima acima de um limite de ter uma resposta clínica ao tratamento por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 16.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9, 10, 17 e 18, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento é administrado em combinação com quimioterapia, terapia direcionada ou um inibidor de ponto de verificação.

20. Método **caracterizado** pelo fato de que é para identificar um indivíduo humano que provavelmente não terá uma resposta clínica a um método de tratamento, de acordo com a reivindicação 10, compreendendo o método

(i) determinar que o(s) peptídeo(s) do(s) ingrediente(s) ativo(s) da composição farmacêutica não compreende(m) duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes, cada um dos quais é um epítopo de células T que tem a capacidade de se ligar a pelo menos três moléculas de HLA da classe I do indivíduo; e

(ii) identificar o indivíduo como tendo probabilidade de não ter uma resposta clínica ao método de tratamento.



Figura 1

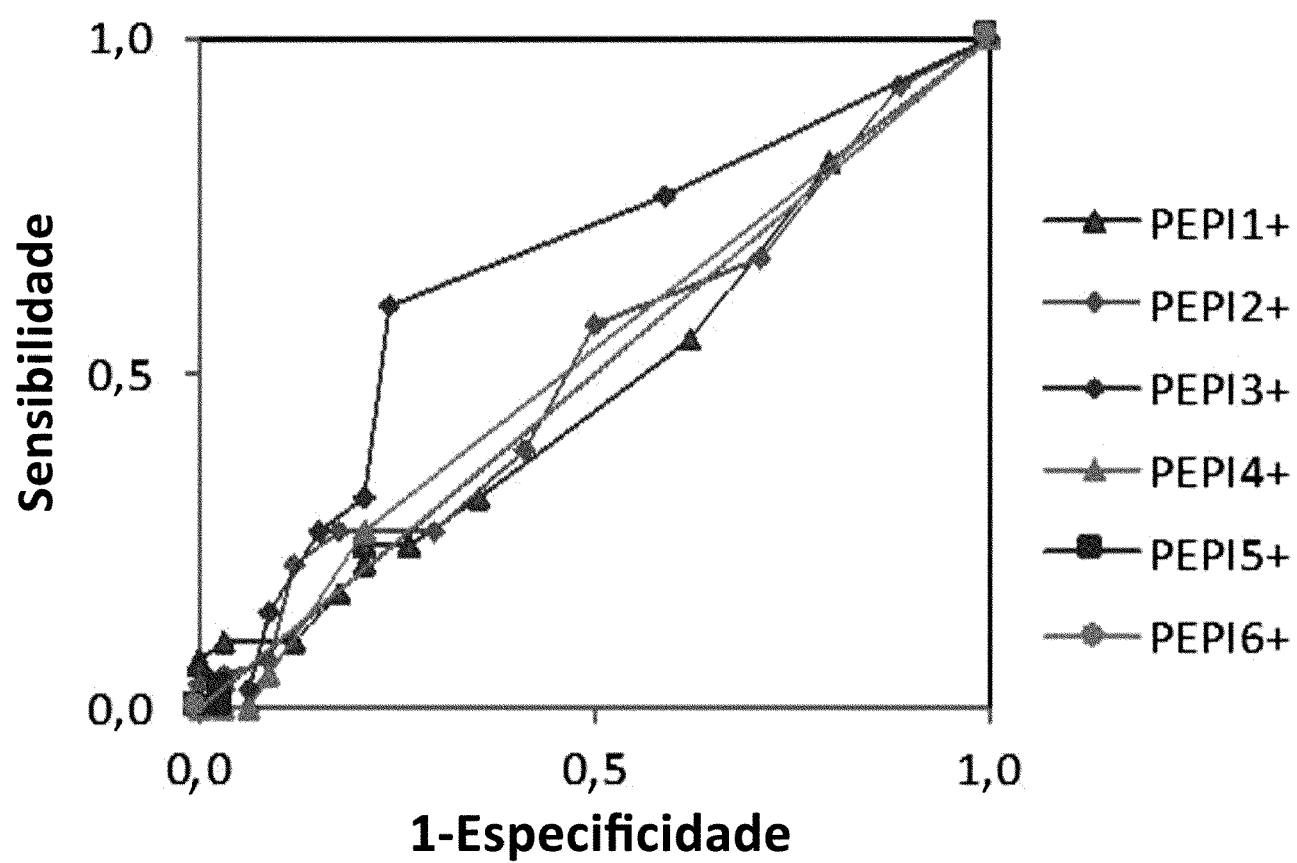


Figura 2

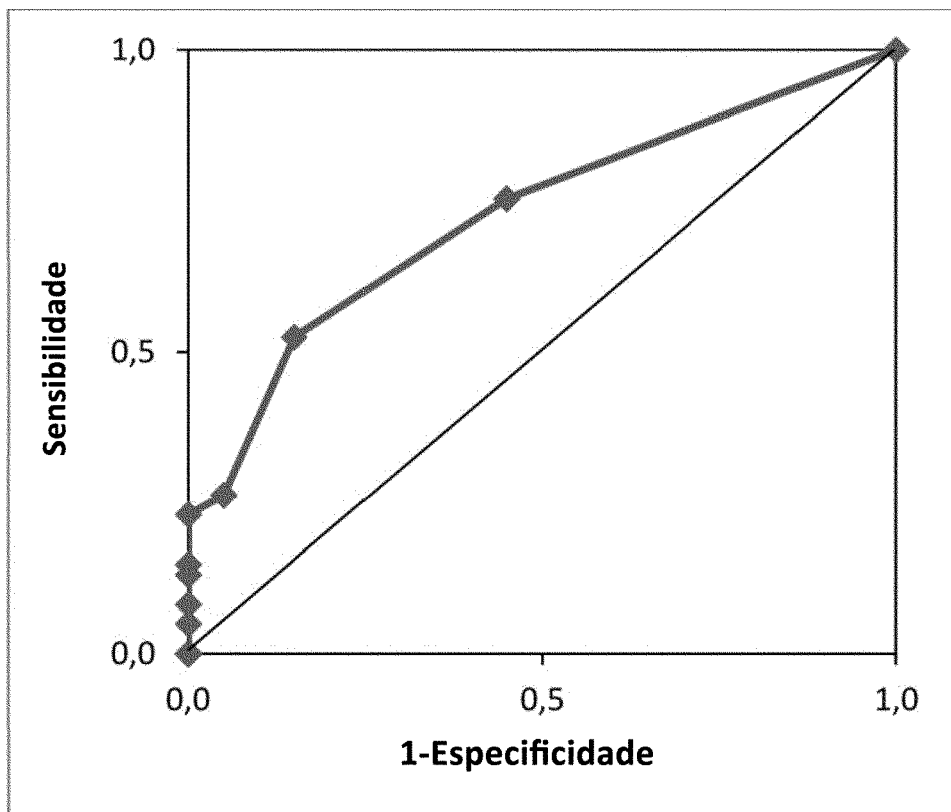


Figura 3A

ID do Paciente	Nº epitopo/"Pools" de HPV-16 E6										Nº epitopo/"Pools" de HPV-16 E7														
	1-19	11-29	21-39	31-49	41-59	51-69	61-79	71-89	81-99	91-109	101-119	111-129	121-139	131-149	141-158	1-19	11-29	21-39	31-49	41-59	51-69	61-79	71-89	81-98	
1	VN	VN	VN	FN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN
2	FN	FN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN
3	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
6	VN	VN	VN	FN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
7	VN	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FN
8	VN	FN	VN	FN	VN	FN	VN	FP	VN	VN	FN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VN
9	VN	VN	VN	VN	FN	FN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
10	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	FP	VN
11	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
13	VN	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
16	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
18	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VN
22	VN	FN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN
23	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
27	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
28	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN
29	FN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
30	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
100	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
102	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
103	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
105	VN	VN	VN	VN	VN	VP	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	VN
107	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN

Figura 3B

ID do Paciente	Nº epitopo/"Pools" de HPV-16 E6												Nº epitopo/"Pools" de HPV-16 E7												
	1-19	11-29	21-39	31-49	41-59	51-69	61-79	71-89	81-99	91-109	101-119	111-129	121-139	131-149	141-159	1-19	11-29	21-39	31-49	41-59	51-69	61-79	71-89	81-99	
1	VN	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP
2	TP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP
3	FP	FP	VN	FP	FP	VP	VN	FP	FP	FP	FP	VP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	VN	FP	FP	FP
6	FP	FP	FP	FN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP
7	FP	FP	FP	FP	FP	VP	VN	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	VN	FP	FP	FP
8	FP	VP	VN	VP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	VN	VN	VP	VN	FP	FP	FP	FP
9	FP	FP	VN	FP	VP	VP	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP
10	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	VN	FP	FP	FP
11	FP	VP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	VN	FP	FP	FP
13	FP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP
16	FP	FP	FP	FP	VN	VP	VN	FP	FP	VP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP
18	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP
22	FP	VP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP
23	VN	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	VN	VP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP
27	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP
28	FP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP
29	VP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP
30	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	VN	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP
100	FP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	VN
102	FP	FP	FP	FP	FP	VP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FN	VN	FP	FP	VN
103	FP	VP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP
105	FP	FP	FP	FP	FP	VP	VP	FP	FP	FP	VN	FP	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP
107	FP	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VP	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP

Figura 4A

Id do Paciente	Nº PEPI/ HPV-16 E6				E7	
	E6.1	E6.2	E6.3	E6.4	E7.1	E7.2
1	FP	VP	VP	FN	VN	FN
2	FP	VP	VP	VN	VN	VP
3	VP	VP	VP	VP	VN	VP
6	VP	VP	VP	FN	VP	VP
7	VP	VP	VP	VP	VN	VP
8	VP	VP	VP	FN	FP	VP
9	VP	VP	VP	FN	FP	VP
10	FP	VP	VP	FN	VN	VP
11	VP	VP	FN	FN	VN	VP
13	VP	VP	FN	FN	VN	FN
16	VP	VP	VP	FN	FN	VP
18	FP	VP	FN	FN	FN	VP
22	VP	VP	VP	FN	FN	FN
23	FP	VP	VP	FN	VN	VN
27	VP	VP	VP	FN	FN	FN
28	VP	VP	VP	FN	VN	FN
29	FP	VP	VP	FN	FP	VP
30	FP	FP	VN	VN	FN	FN
100	VP	VP	VP	FN	VN	VP
102	VP	VP	VP	FN	FN	VP
103	VP	VP	VP	FN	VN	VN
105	VP	VP	VP	VP	VN	VN
107	VP	VP	FP	FN	VN	FN

Figura 4B

Id do Paciente	Nº epít./"pools" de HPV-16 E6&E7					
	E6.1	E6.2	E6.3	E6.4	E7.1	E7.2
1	FP	VP	VP	FN	FP	VP
2	FP	VP	VP	VN	VN	VP
3	VP	VP	VP	FN	FP	VP
6	VP	VP	VP	FN	VP	VP
7	VP	VP	VP	FN	FP	VP
8	VP	VP	VP	FN	FP	VP
9	VP	VP	VP	FN	FP	VP
10	FP	VP	VP	FN	FP	VP
11	VP	VP	VP	FN	FP	VP
13	VP	VP	VP	FN	VN	VP
16	VP	VP	VP	FN	VN	VP
18	FP	VP	VP	FN	FN	VP
22	VP	VP	VP	FN	VP	VP
23	FP	VP	VP	FN	FP	FP
27	VP	VP	VP	FN	VP	VP
28	VP	VP	VP	FN	FP	VP
29	FP	VP	VP	FN	FP	VP
30	FP	FP	FP	VN	FN	VP
100	VP	VP	VP	FN	FP	VP
102	VP	VP	VP	FN	VP	VP
103	VP	VP	VP	FN	VN	FP
105	VP	VP	VP	FN	VN	FP
107	VP	VP	VP	FN	FP	VP

Figura 5

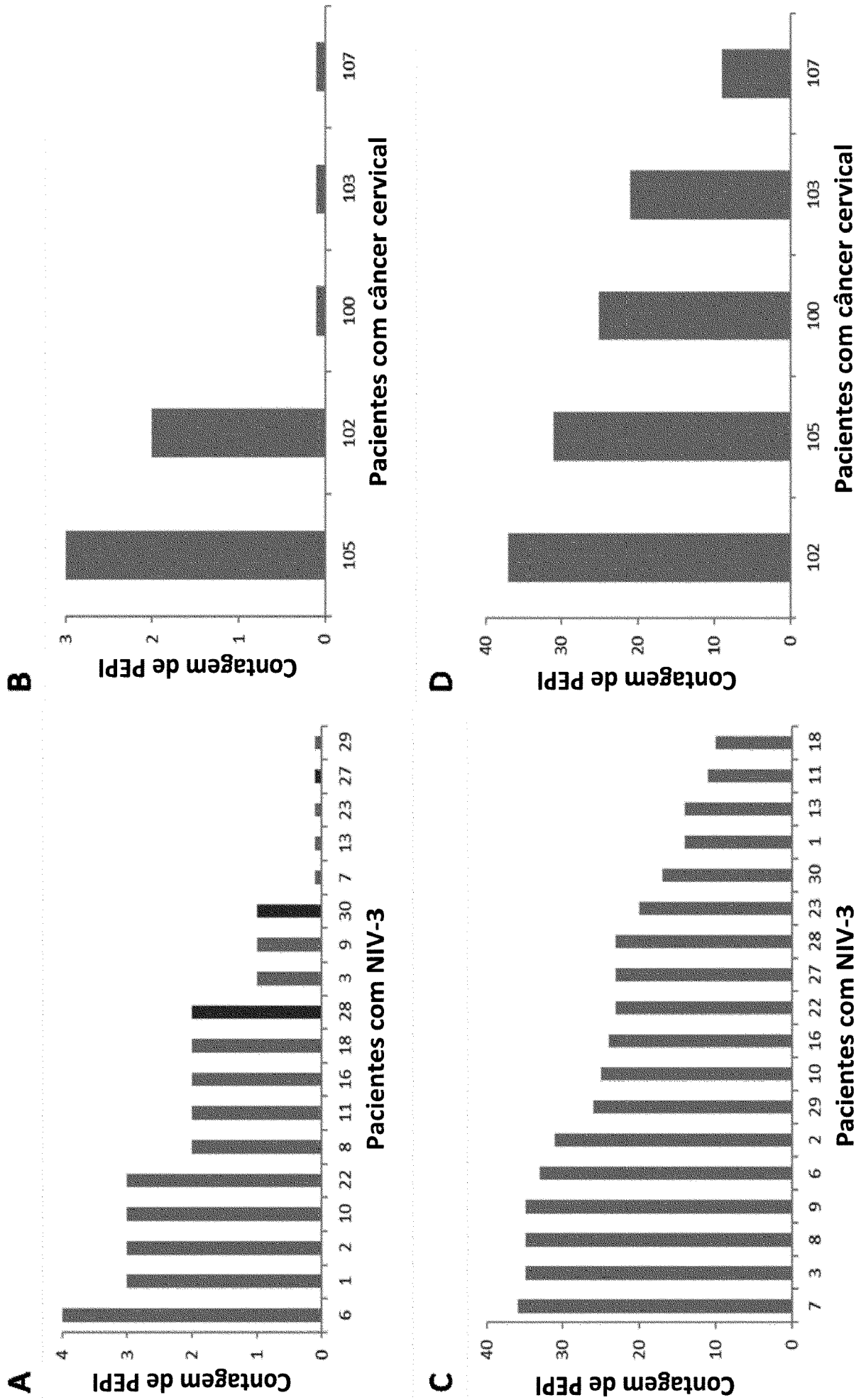


Figura 6

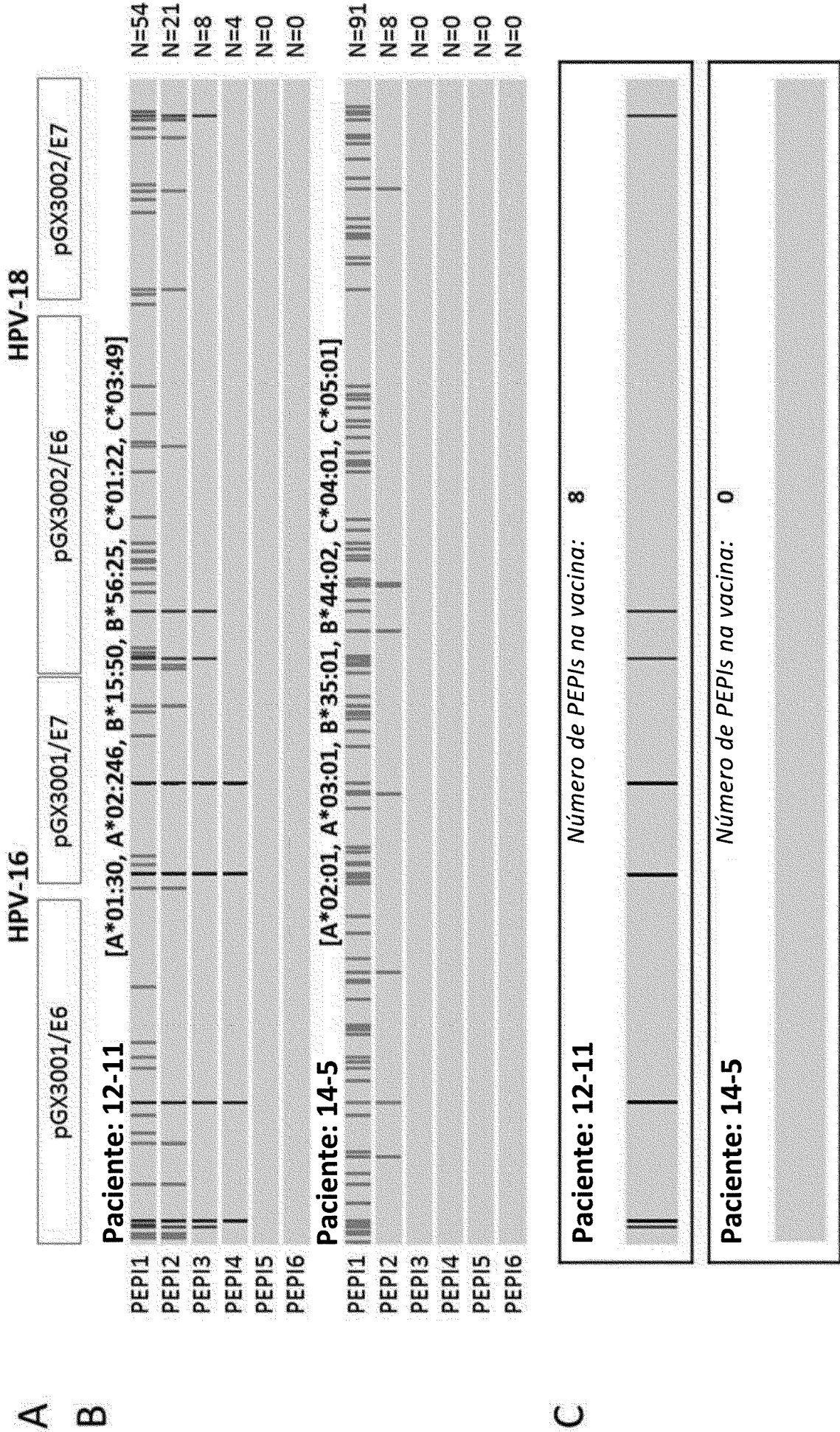
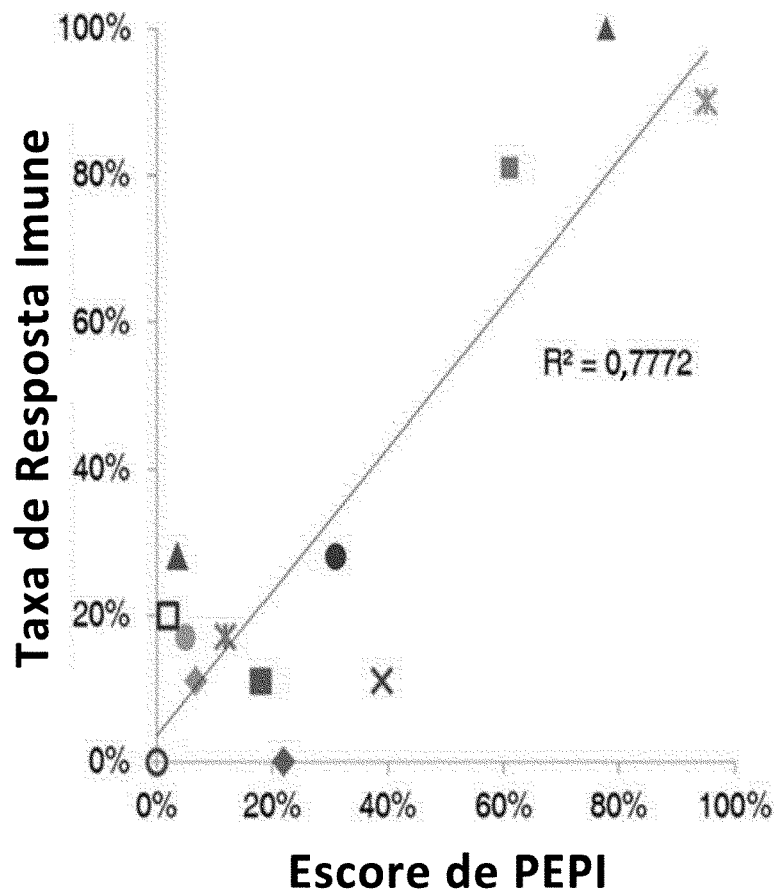


Figura 7



- ◆ MMNLMQPKTQQTYTYD (JUP)
- GRGSTTTNYLLDRDDYRNTSD (ADA17)
- ◆ LKKGADGGKLDGNAKLNRSLK (BAP31)
- × FPPKDDHTLKFLYDDNQRPYPP (TOP2A)
- QRPPFSQLHRFLADALNT (DDR1)
- × RYRKPDYTLDDGHGLLRFKST (Abl-2)
- ALDQCKTSCALMQQHYDQTSFSSP (ITGB8)
- STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (Muc-1)
- ▲ YLEPGPVTA (gp-100)
- × MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVV (Muc-1)
- SSKALQRPV (Bcr-abl)
- ▲ RMFPNAPYL (WT1)
- RMFPNAPYL (WT1, HLA-A\*0201)



Figura 8

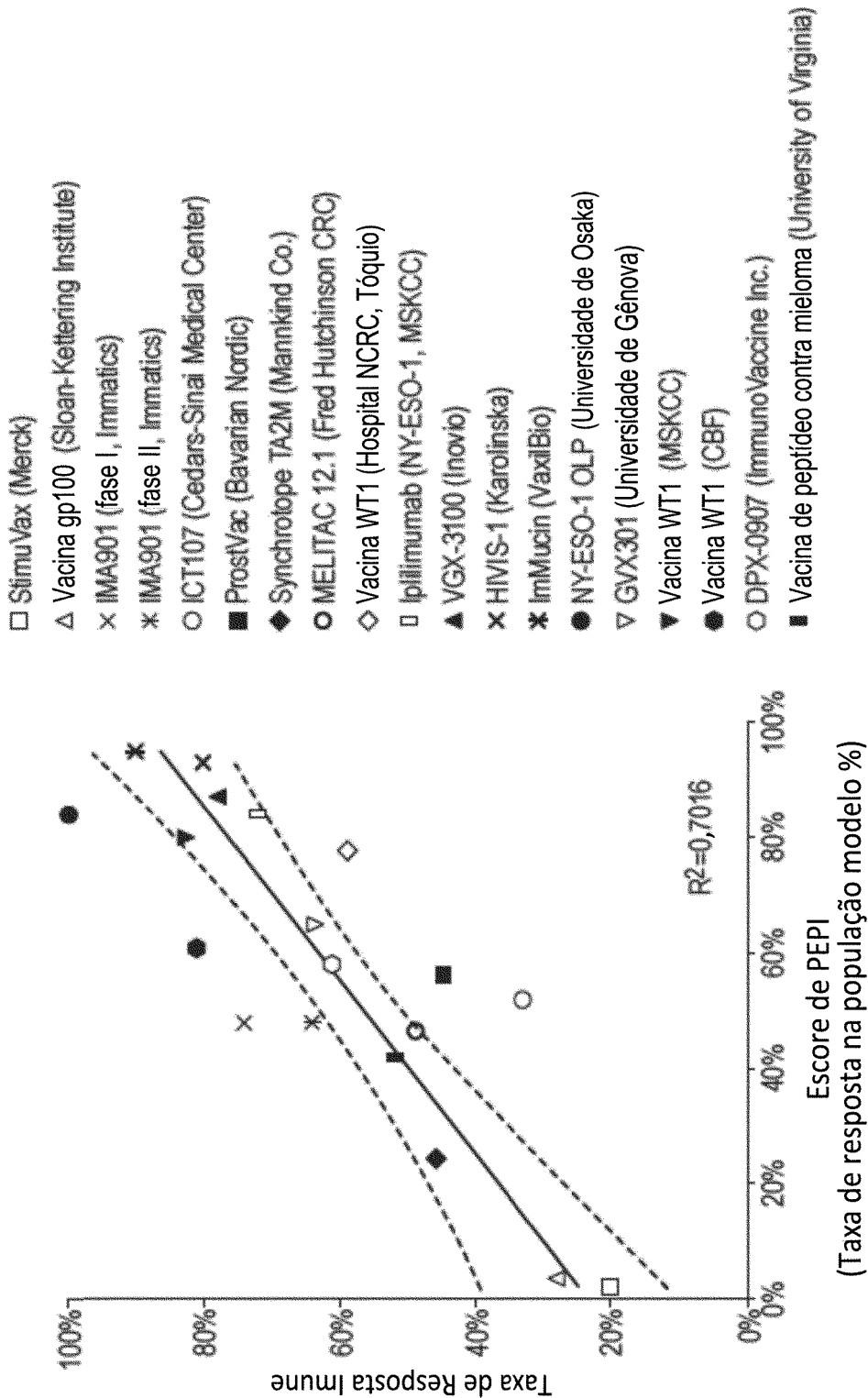


Figura 9

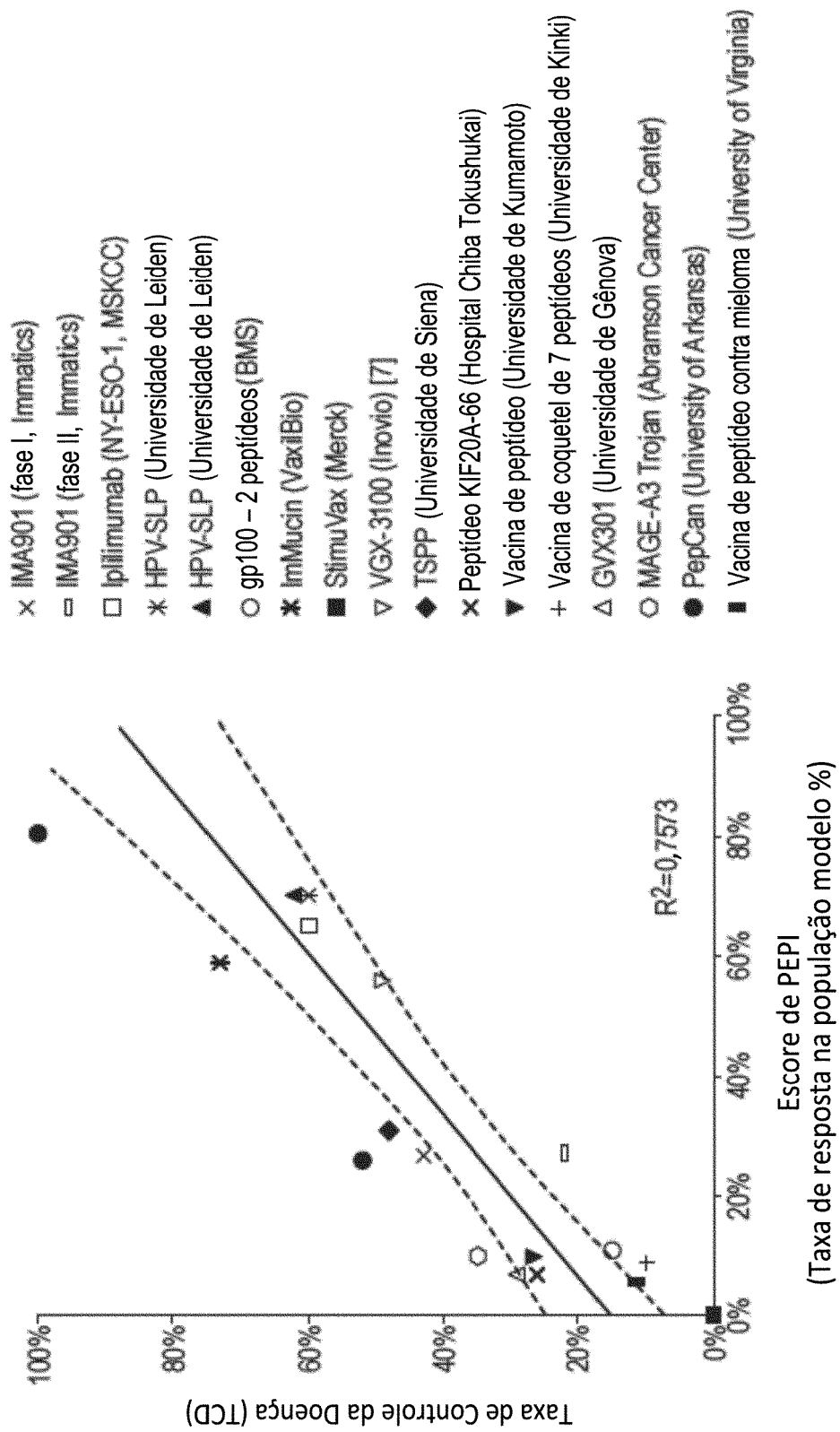


Figura 10

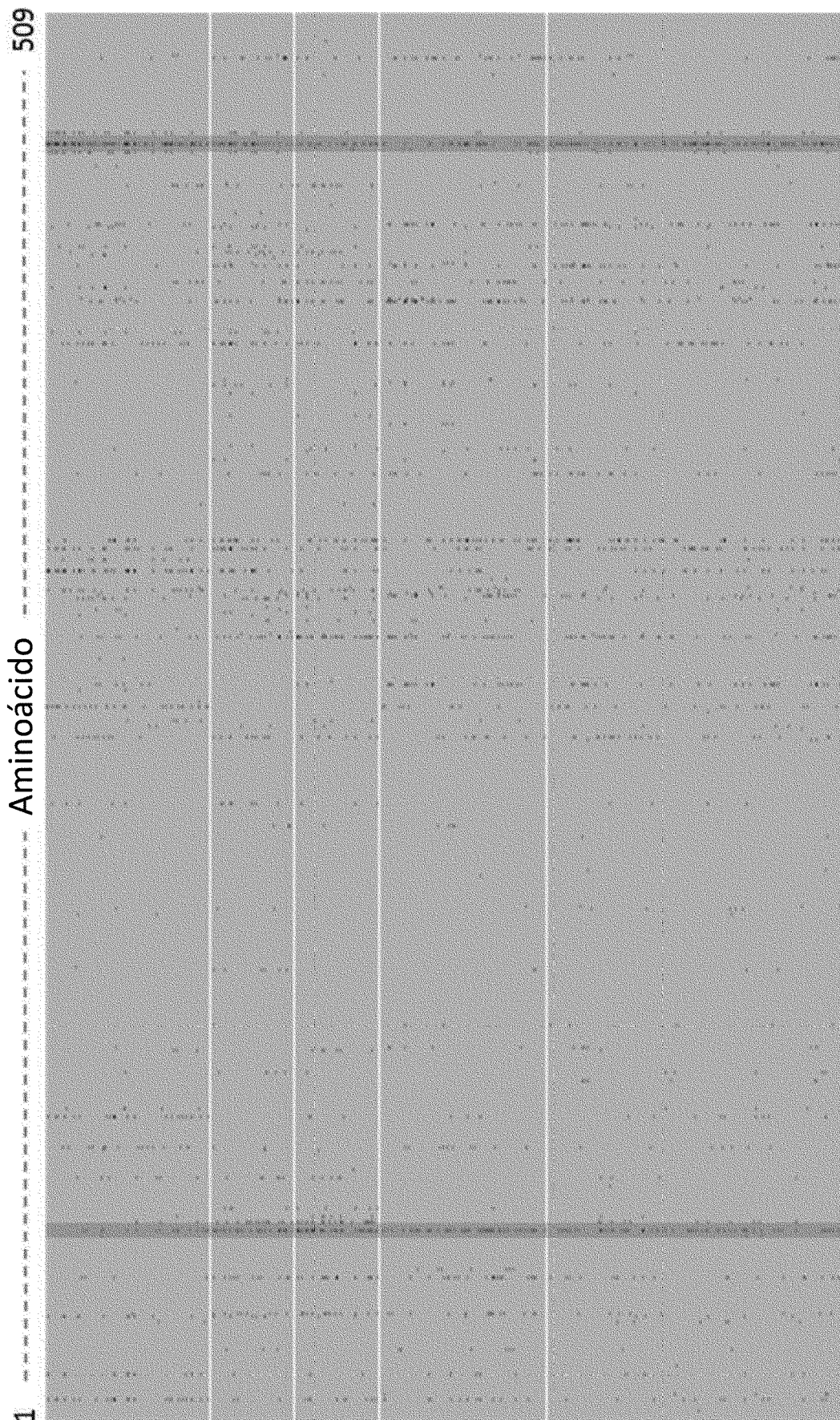
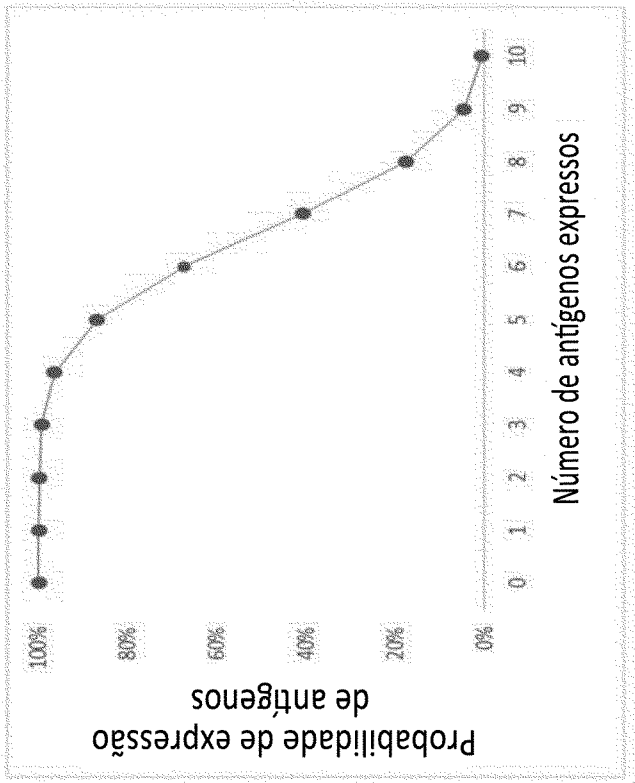


Figura 11



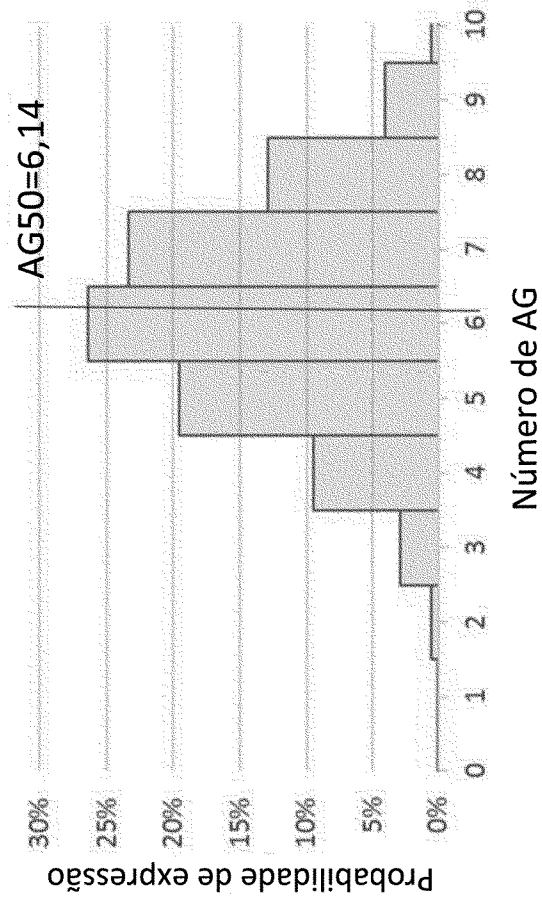
Conclusão

- 1. 99% dos tumores expressam ≥3 antígenos
- 2. Nenhuma biópsia é necessária

Antígenos	Taxa de expressão
Antígenos de testículo-câncer	Determinados a partir de 1053 amostras tumorais
AKAP-4	85%
BORIS	71%
SPAG9	88%
PRAME	55%
NY-SAR-35	48%
MAGE-A9	44%
NY-BR-1	47%
SURVIVIN	71%
MAGE-A11	59%
HOM-TES-85	47%

Figura 12

A.



B.

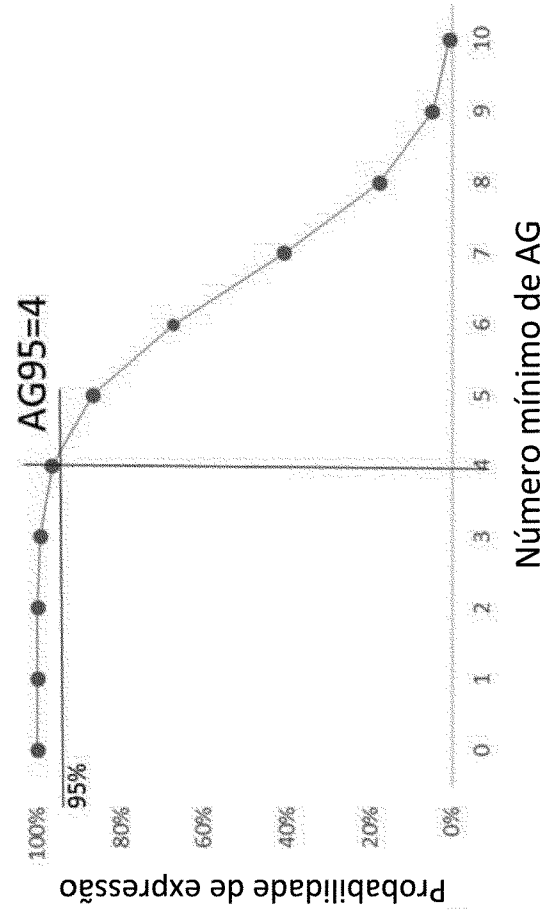
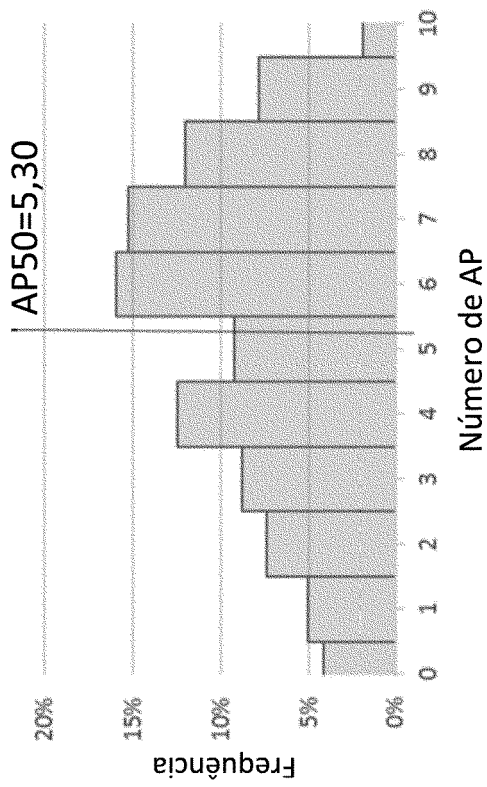


Figura 13

A.



B.

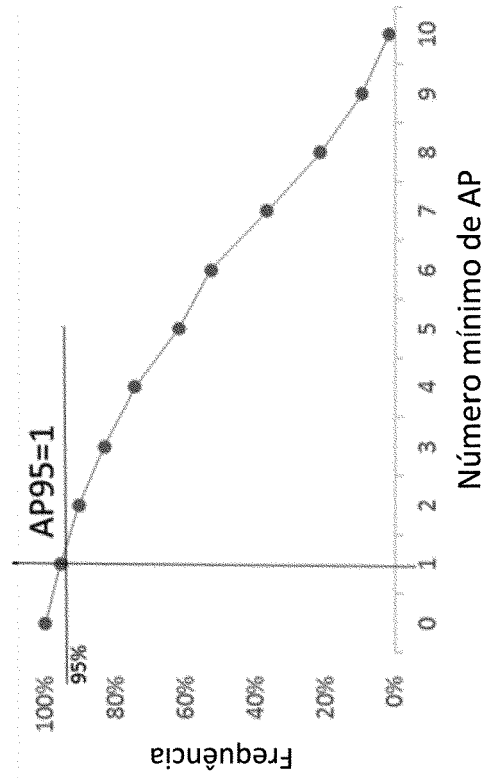
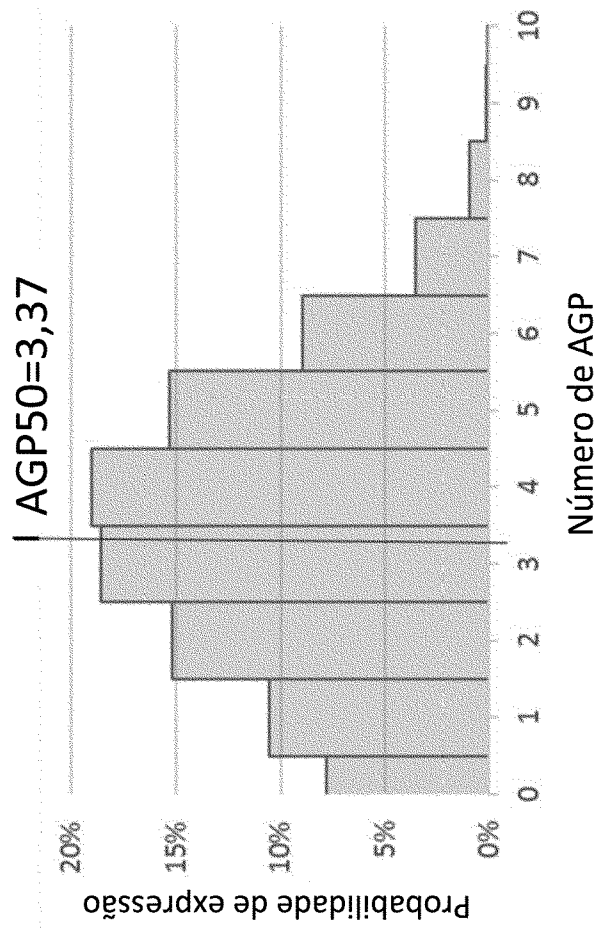


Figura 14

A.



B.

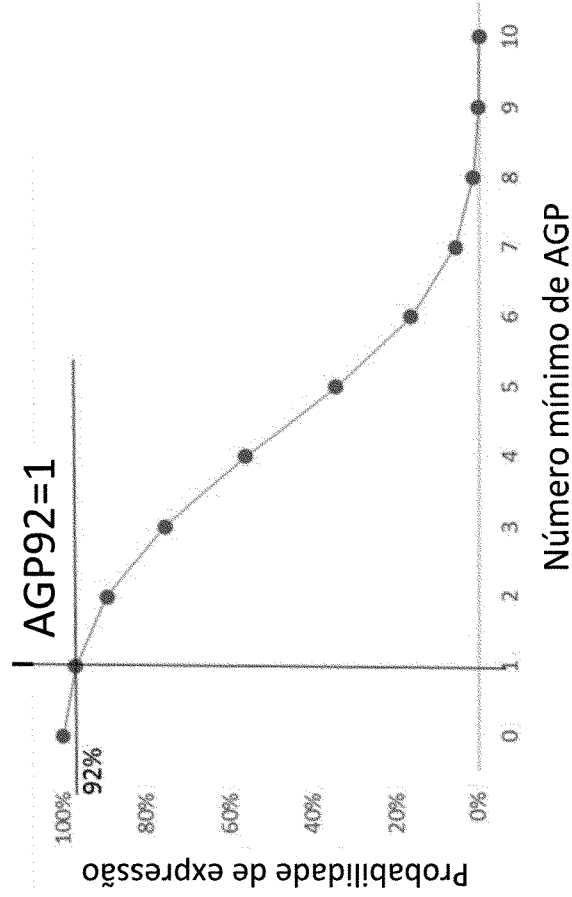


Figura 15

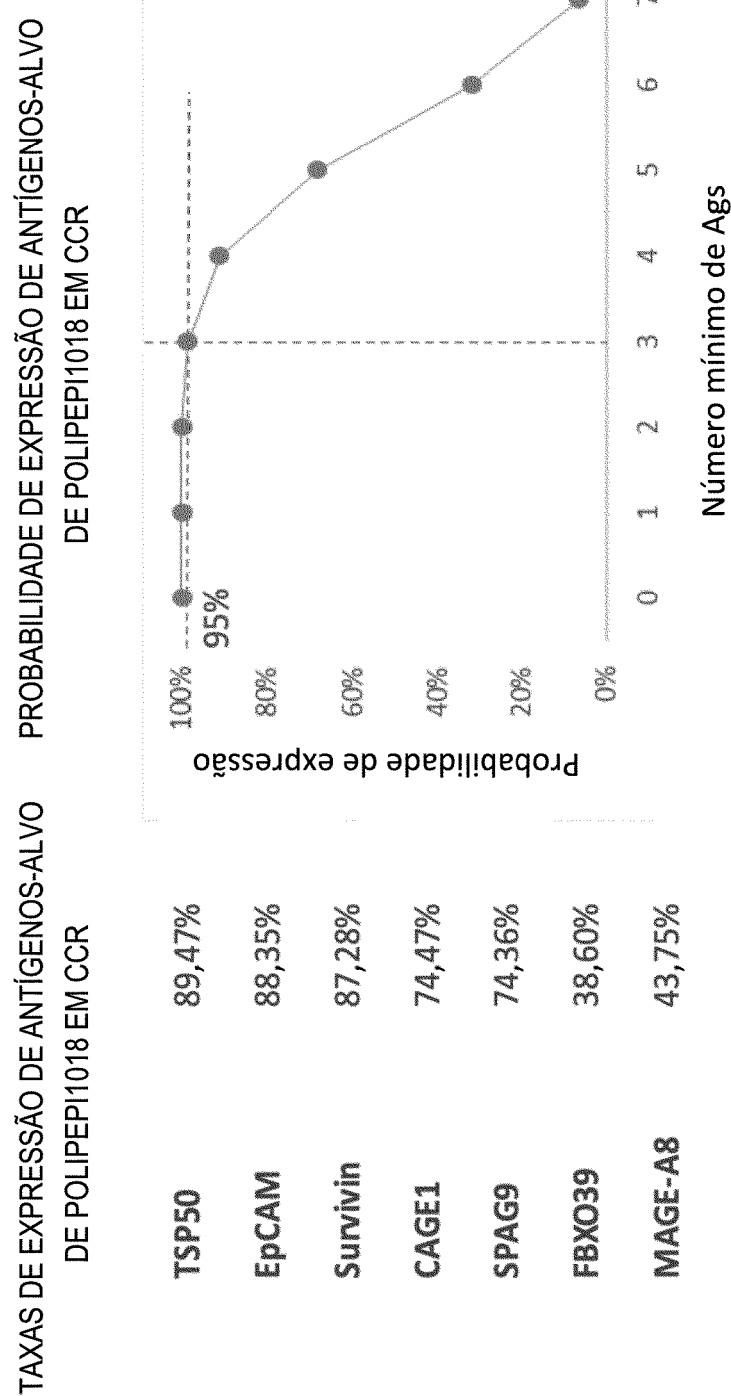




Figura 16

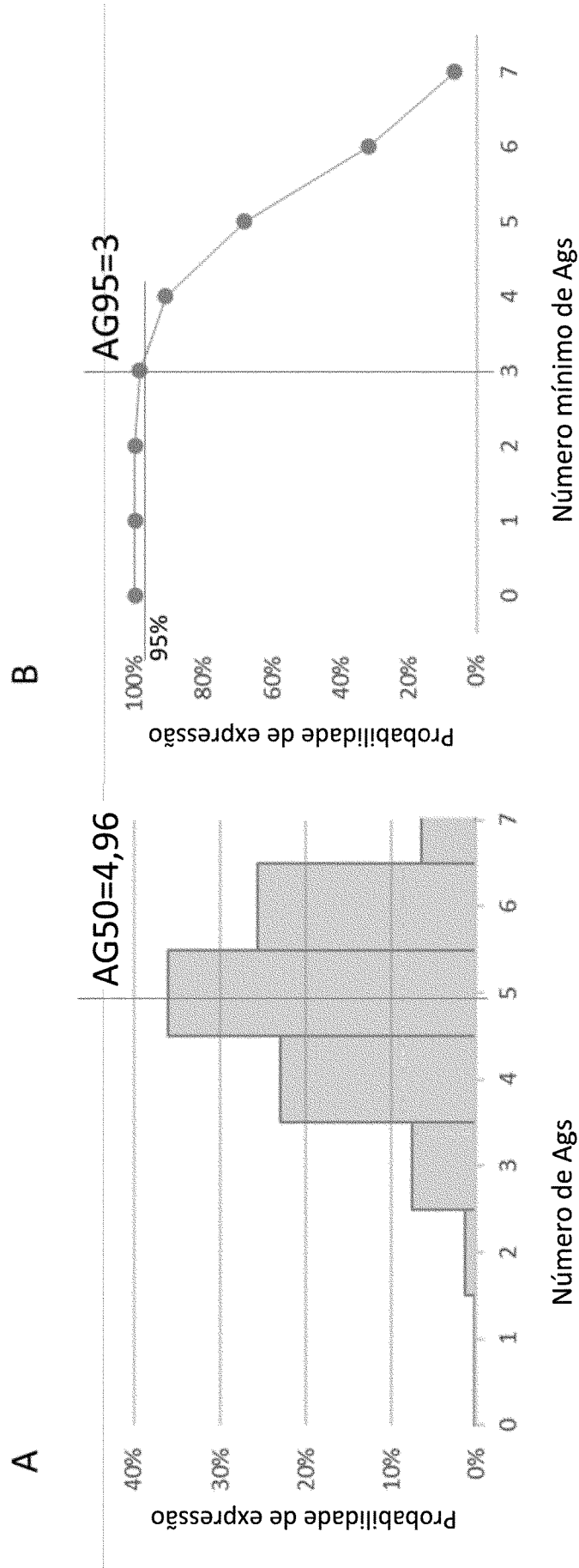
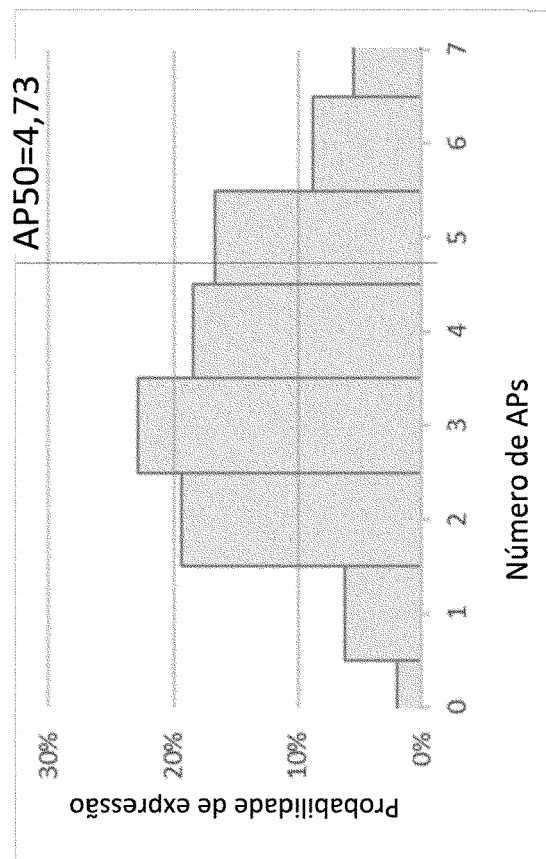


Figura 17

A



B

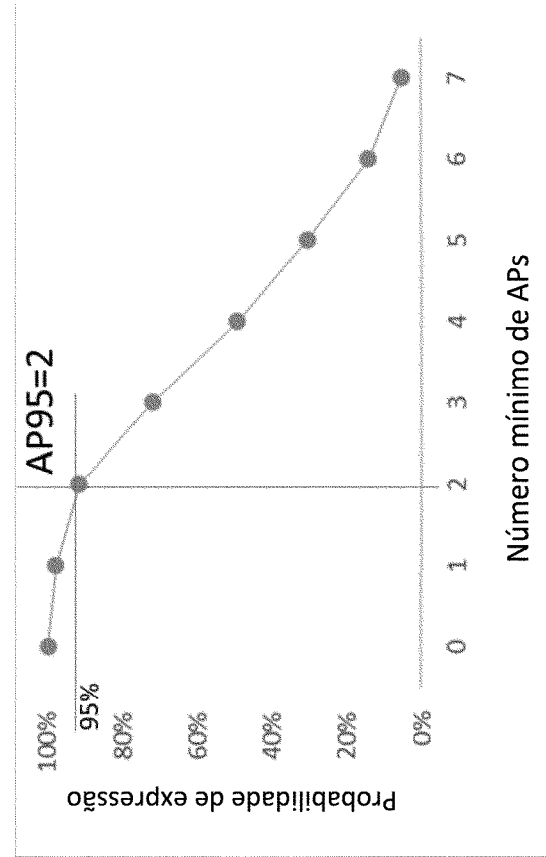


Figura 18

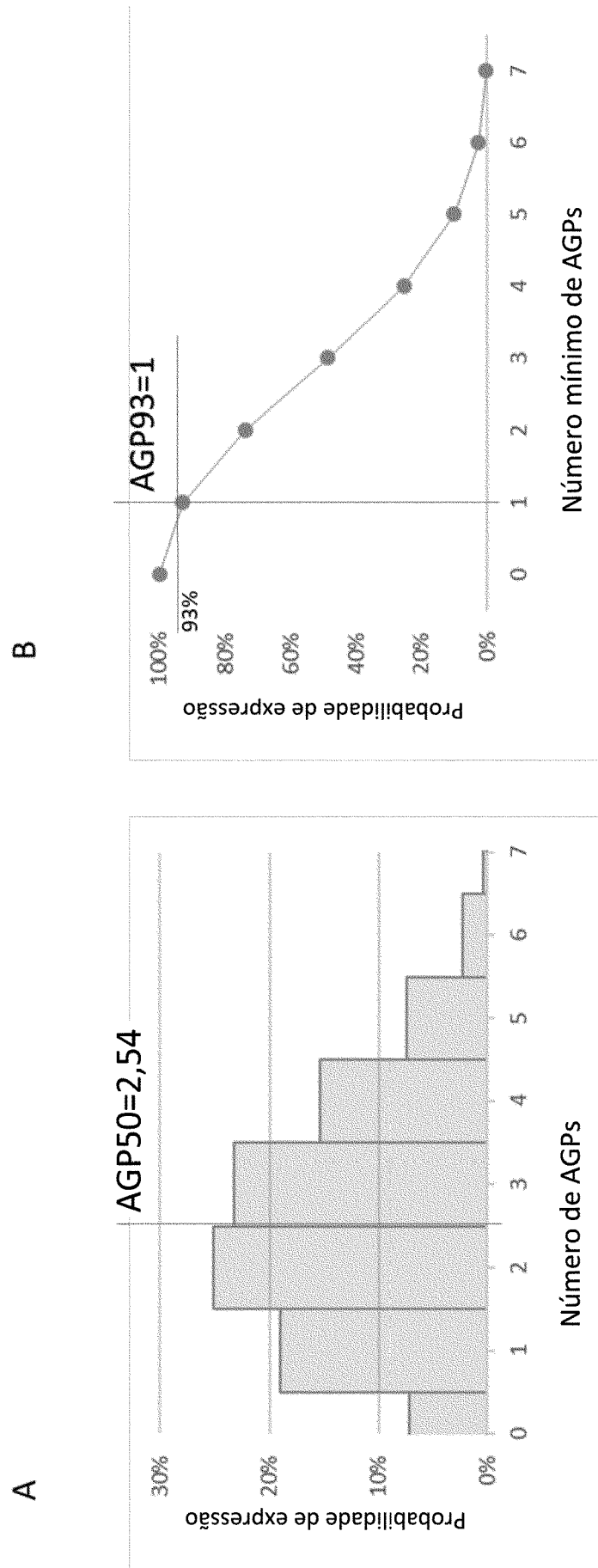


Figura 19

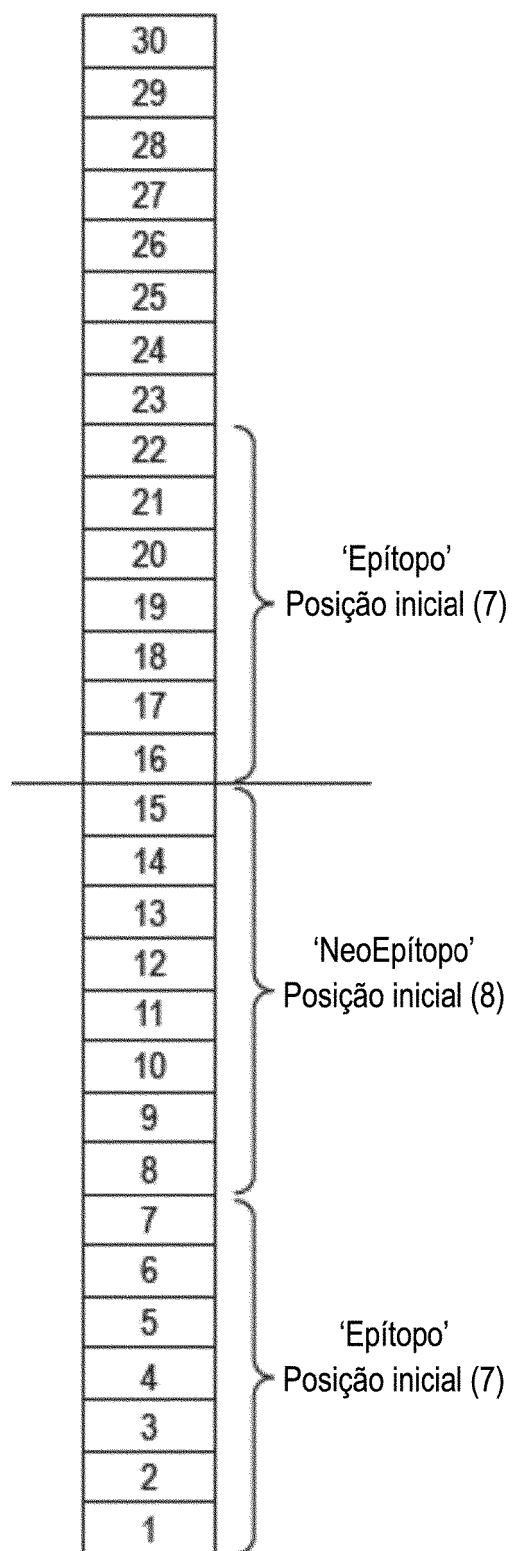


Figura 20

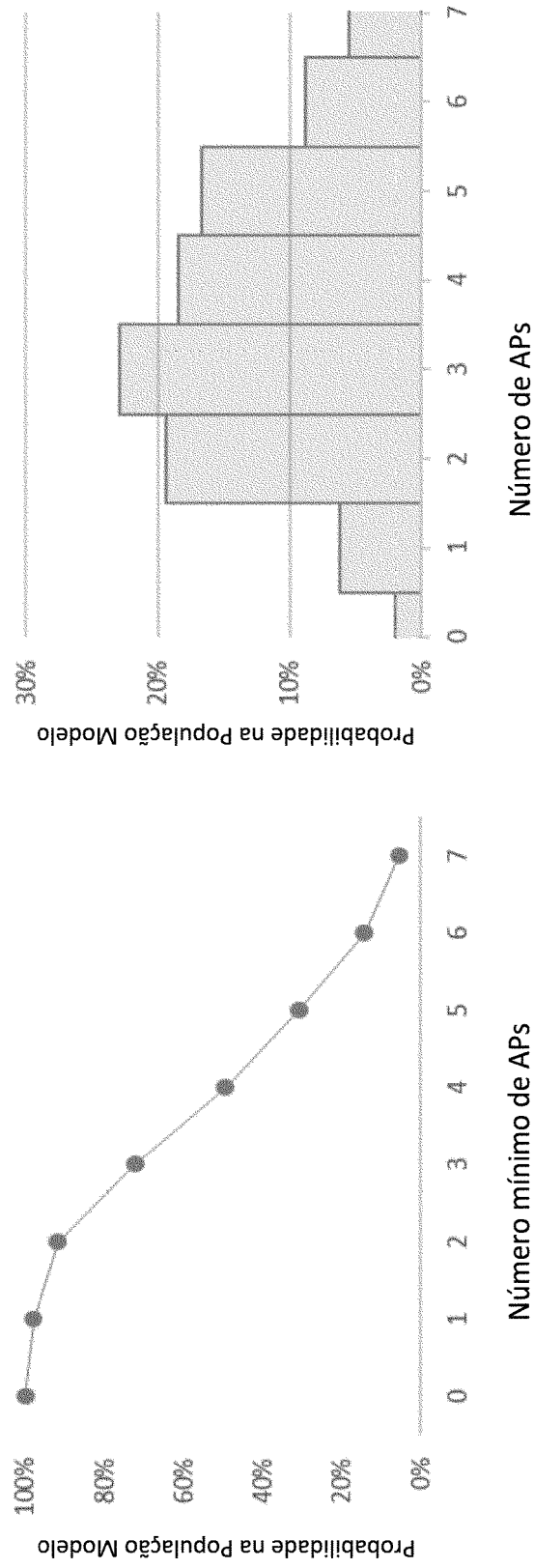


Figura 21

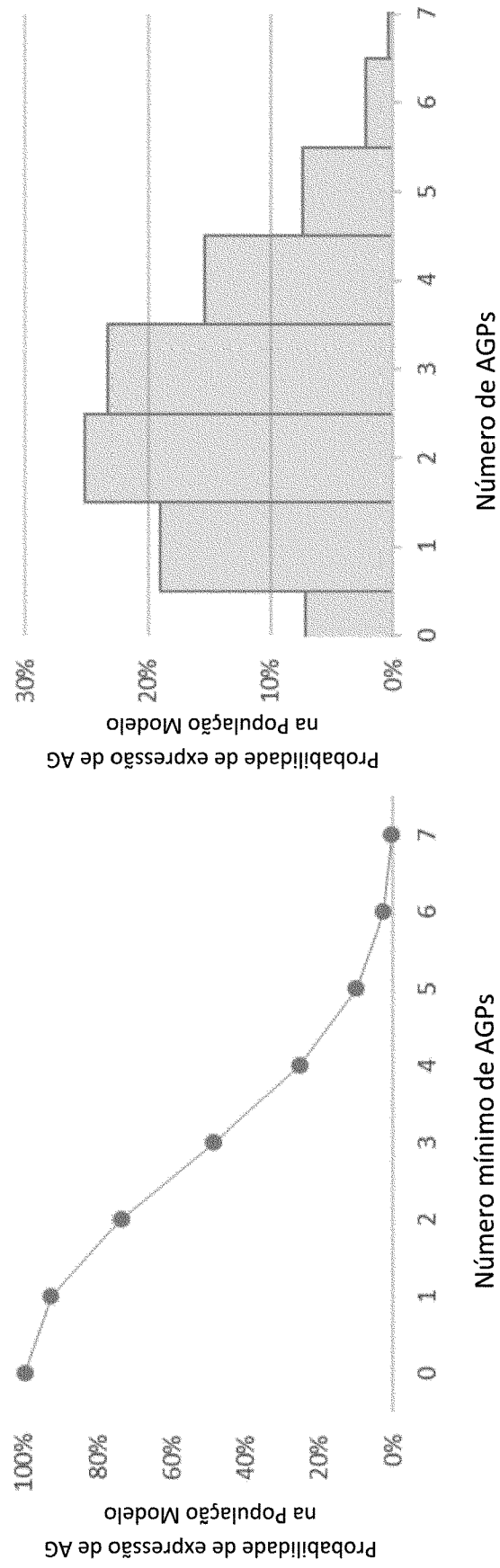
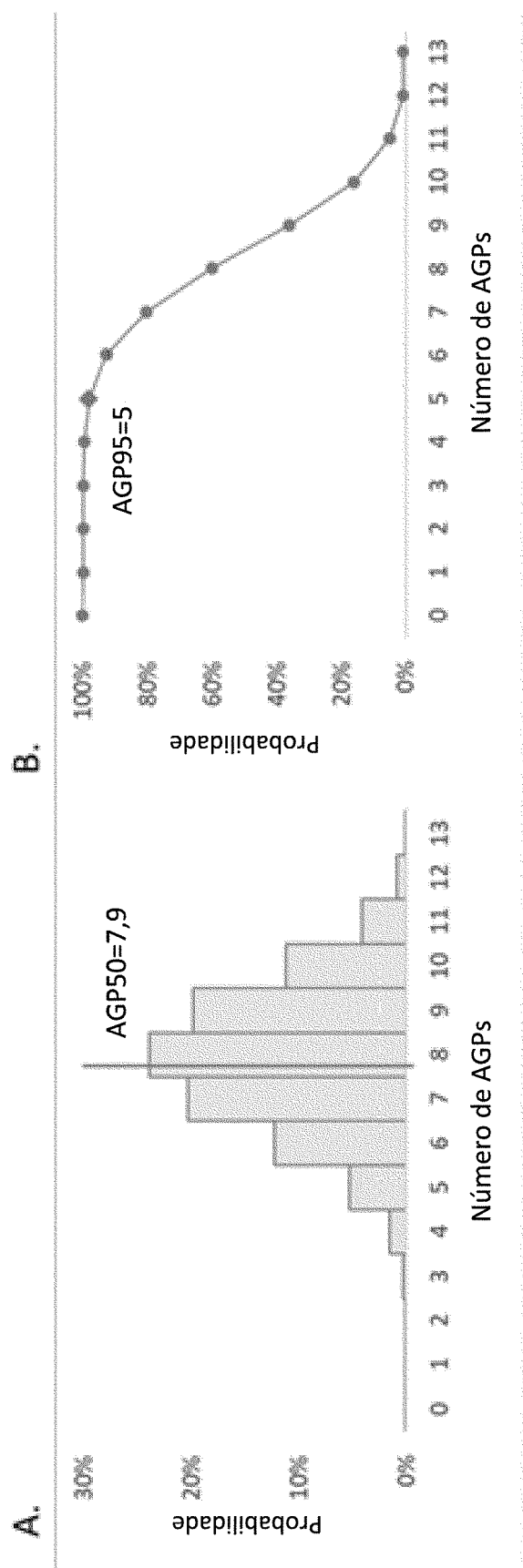


Figura 22



# Figura 23

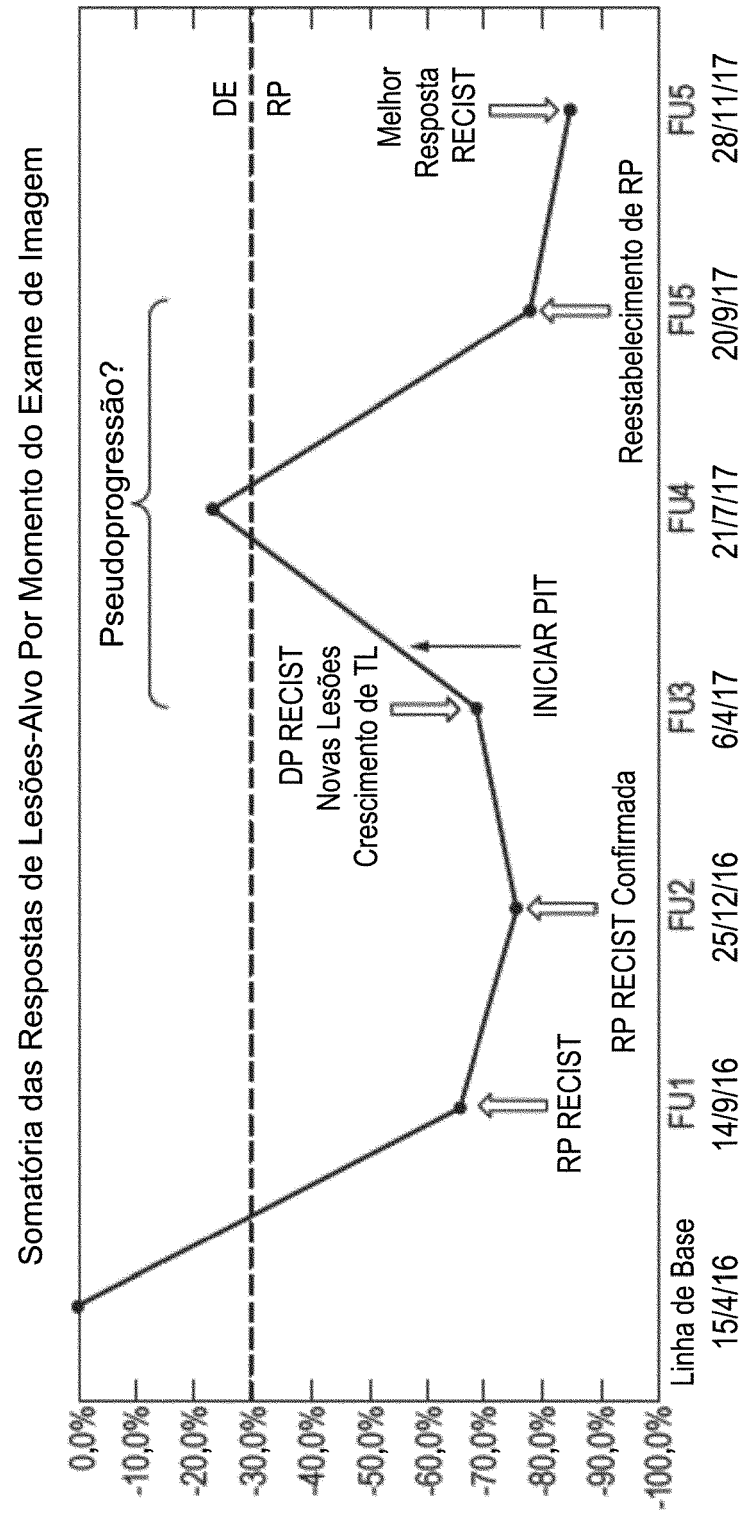
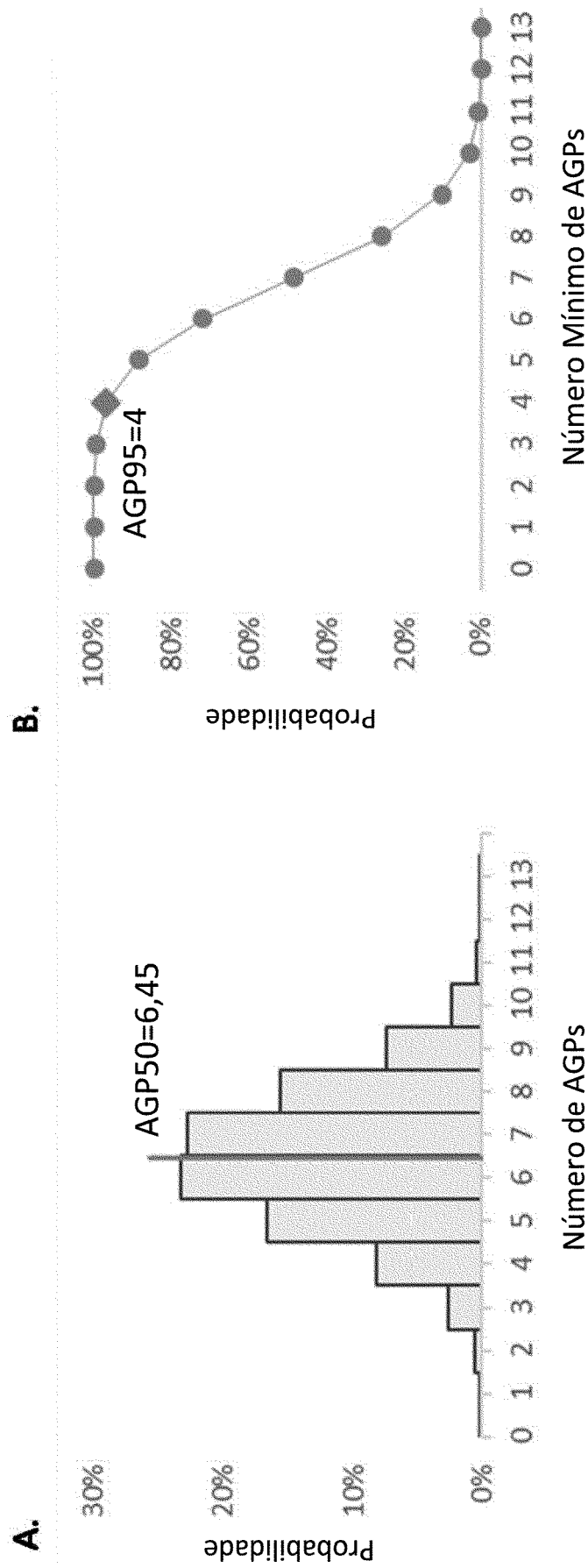




Figura 24



Resumo da Patente de Invenção para: **"VACINAS PEPTÍDICAS"**

A divulgação refere-se a polipeptídeos e composições farmacêuticas compreendendo polipeptídeos que encontram uso na prevenção ou tratamento de câncer, em particular câncer de mama, câncer de ovário e câncer colorretal. A divulgação também se refere a métodos para induzir uma resposta de células T citotóxicas em um indivíduo ou tratar de câncer administrando-se composições farmacêuticas compreendendo os peptídeos, e métodos de diagnóstico complementares para identificar indivíduos para tratamento. Os peptídeos compreendem epítomos de células T que são imunogênicos em uma alta porcentagem de pacientes.

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

### **Código de Controle**

#### **Campo 1**



#### **Campo 2**



#### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências J.01.007.PI-BR.TXT
- Data de Geração do Código: 01/11/2019
- Hora de Geração do Código: 10:27:08
- Código de Controle:
  - Campo 1: E9DD479E0B209F2A
  - Campo 2: 24BFCD11368EBA3E