



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

(21) BR 112021004244-0 A2



(22) Data do Depósito: 06/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 25/05/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES, VACINA, PEPTÍDEO ISOLADO E USO DE UMA COMPOSIÇÃO

(51) Int. Cl.: A61K 38/16; A61K 39/12; C07K 14/15.

(30) Prioridade Unionista: 06/09/2018 EP 18306173.8.

(71) Depositante(es): CENTRE LÉON-BÉRARD; UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM).

(72) Inventor(es): STÉPHANE DEPIL; LAURIE TONON; CHRISTOPHE CAUX; PAOLA BONAVENTURA; JENNY VALLADEAU.

(86) Pedido PCT: PCT EP2019073883 de 06/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/049169 de 12/03/2020

(85) Data da Fase Nacional: 05/03/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES, VACINA, PEPTÍDEO ISOLADO E USO DE UMA COMPOSIÇÃO. Uma composição ou vacina compreendendo pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo in vivo, o peptídeo consistindo em, ou compreendendo, antígenos derivados de HERV-K compartilhados e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Composição compreendendo linfócitos T citotóxicos (CTLs) de um paciente tratado com tal peptídeo, ou compreendendo células T modificadas com receptor de células T (TCR) que reconhecem tal peptídeo.

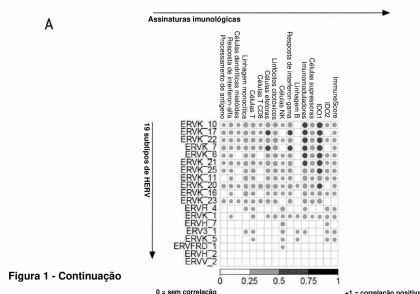


Figura 1 - Continuação

“COMPOSIÇÕES, VACINA, PEPTÍDEO ISOLADO E USO DE UMA COMPOSIÇÃO”

[001] A presente invenção está relacionada à identificação de epítomos ou neoepítomos derivados de antígenos HERV-K que são compartilhados em alguns subtipos tumorais e que podem ser usados em diagnóstico, prognóstico e imunomonitoramento, bem como em composições antigênicas, composições imunogênicas, em vacinas anticâncer ou imunoterapias baseadas em células T. A invenção, portanto, se refere aos campos de câncer e imunoterapia e ao desenvolvimento de composições imunogênicas antigênicas baseadas em peptídeos, incluindo um ou mais, de preferência vários desses epítomos e úteis no diagnóstico, prognóstico e imunomonitoramento e no tratamento e prevenção de câncer, e de composições imunogênicas e vacinas incluindo um ou mais, de preferência vários desses epítomos para o tratamento e prevenção de câncer. Como alternativa, as composições da invenção compreendem um vetor ou vetores que realizam ou conduzem à expressão dos referidos peptídeos *in vivo*, por exemplo, os vetores podem ser vetores de DNA ou RNA, ou vetores bacterianos ou virais.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Retrovírus endógenos humanos (HERVs) representam 8% do genoma humano. Eles provavelmente correspondem a resquícios de infecções de linhagens germinativas ancestrais de retrovírus exógenos. A maioria dos genes HERV são não funcionais devido à recombinação, mutações e deleções do DNA, mas alguns produzem proteínas funcionais, incluindo antígeno grupo-específico (Gag), polimerase (Pol) com transcriptase reversa e a unidade de superfície do envelope (Env). A expressão de HERVs é reprimida em células normais por mecanismo epigenético.

[003] Os HERVs têm fortes propriedades imunogênicas ligadas a um “mimetismo viral” e sua expressão é aumentada em alguns tumores sólidos

devido à desmetilação. Acredita-se que os HERVs representem possíveis agentes patogênicos em carcinogênese, onde poderiam atuar por mutagênese insercional ou envolvimento em aberrações cromossômicas. Algumas proteínas HERV, como HERV-K Rec e Np9, também são oncogenes putativos.

[004] A expressão de HERVs em câncer tem sido associada a diferentes efeitos no sistema imunológico:

- imunomodulação, através do domínio imunossupressor da unidade Env;
- ativação de imunidade inata por dsRNA de HERV (desencadeando a sinalização de interferon do tipo I inata);
- indução de respostas imunológicas adaptativas contra antígenos HERV.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[005] Assim, de acordo com a presente invenção, são fornecidos peptídeos isolados ou purificados, bem como composições compreendendo pelo menos um desses peptídeos, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o peptídeo consistindo em, ou compreendendo um epítopo que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7). A composição pode ainda compreender um líquido, tampão ou veículo apropriado. Nas composições para uso no tratamento de um ser humano, a composição compreende ainda um veículo, carreador ou excipiente farmacologicamente aceitável.

[006] Em particular, é fornecida uma composição imunogênica compreendendo pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o peptídeo consistindo

em, ou compreendendo, um epítopo que consiste em uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nas sequências FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7) e um veículo, carreador ou excipiente farmacologicamente aceitável.

[007] Também é fornecida uma vacina ou vacina anticâncer compreendendo pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o peptídeo consistindo em, ou compreendendo, um epítopo consistindo em uma sequência selecionada a partir de grupo que consiste nas sequências FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7) e um veículo, carreador ou excipiente farmacologicamente aceitável.

[008] As composições de acordo com a invenção podem compreender, em particular:

2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos, ou um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão dos referidos 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos *in vivo*, os peptídeos tendo de 9 a 100 resíduos de aminoácidos, cada um compreendendo pelo menos um, em particular um, dos epítopos das sequências SEQ ID NO: 1-7, e cada peptídeo compreendendo pelo menos um epítopo diferente em relação aos outros; ou

pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o referido peptídeo tendo de 9 a 100 resíduos de aminoácidos e compreendendo 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítopos das sequências SEQ ID NO: 1-7.

[009] Em uma forma de realização, as composições de acordo

com a invenção podem compreender, em particular:

2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos, ou um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão dos referidos 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos *in vivo*, os peptídeos tendo de 9 a 100 resíduos de aminoácidos, um compreendendo o epítopo da sequência SEQ ID NO: 1 ou 6, e pelo menos um outro compreendendo pelo menos um dos outros epítopos das sequências SEQ ID NO: 1-7, e cada peptídeo compreendendo pelo menos um epítopo diferente em relação aos outros; ou

pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o referido peptídeo tendo de 9 a 100 resíduos de aminoácidos e compreendendo 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítopos das sequências SEQ ID NO: 1-7, incluindo o epítopo da sequência SEQ ID NO: 1 ou 6, em particular ambos.

[010] Como será apresentado aqui a seguir, as composições de acordo com a invenção podem compreender as seguintes formas de realização (no entanto, outras formas de realização também aparecerão a partir do restante da descrição):

[011] - A composição compreende 2, 3, 4, 5, 6 ou os 7 peptídeos das sequências SEQ ID NO: 1 a 7; ou compreende um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão *in vivo* destes peptídeos; em uma forma de realização, o peptídeo de sequência SEQ ID NO: 1 ou 6 ou ambos esses peptídeos está/ estão presentes ou expressos;

[012] - A composição compreende um peptídeo que compreende 9 a 100 resíduos de aminoácidos e pelo menos um dos referidos peptídeos de sequência SEQ ID NO: 1 a 7; o peptídeo pode compreender 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítopos revelados; em uma forma de realização, a composição pode compreender os epítopos gag e/ou os epítopos pol, conforme revelado neste documento, ou pelo menos dois ou três desses epítopos de gag e/ou pol; ou

compreende um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão *in vivo* desse ou desses peptídeos; em uma forma de realização, o peptídeo compreendido ou expresso inclui o peptídeo de sequência SEQ ID NO: 1 ou 6, ou ambos esses peptídeos;

[013] - A composição compreende 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos com 9 a 100 resíduos de aminoácidos, cada um compreendendo pelo menos um, de preferência um, dos epítomos das sequências SEQ ID NO: 1 a 7, e cada peptídeo compreende pelo menos um epítomo diferente em relação aos outros; ou compreende um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão *in vivo* destes peptídeos; em uma forma de realização, o peptídeo de sequência SEQ ID NO: 1 ou 6, ou ambos esses peptídeos está/ estão presentes ou expressos;

[014] - Cada peptídeo contido ou expresso de 9 a 100 resíduos de aminoácidos compreende um epítomo específico (diferente dos outros peptídeos na composição) de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

[015] - O(s) peptídeo(s) contido(s) ou expresso(s) compreende(m) 9 a 50 resíduos de aminoácidos de um gag ou pol de HERV incluindo pelo menos um dos referidos peptídeos de sequência SEQ ID NO: 1 a 7;

[016] - A composição compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos selecionados a partir do grupo que consiste nos peptídeos de SEQ ID NO: 8 a 14; ou compreende um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão *in vivo* deste ou destes peptídeos; em uma forma de realização, o peptídeo de sequência SEQ ID NO: 8 ou 13, ou ambos esses peptídeos está/ estão presentes ou expressos.

[017] Os epítomos das sequências SEQ ID NO: 4, 2 e 1 são de HERV-K gag. Os epítomos das sequências SEQ ID NO: 5, 3, 6 e 7 são de HERV-K pol. Estes são epítomos HLA-A2 de MHC de classe I. Em uma forma de realização, a composição compreende ou expressa 1, 2 ou os 3 epítomos de HERV-K gag. Em uma forma de realização, a composição compreende ou

expressa 1, 2, 3 ou os 4 epítomos de HERV-K pol.

[018] No contexto da composição, composição imunogênica ou vacina de acordo com a invenção, o peptídeo contido ou expresso pode compreender 9 a 100, em particular 9 a 70, ou 9 a 50, 40, 30, 25, 20, resíduos consecutivos, preferencialmente esses resíduos são de HERV-K gag e/ou pol, mais preferencialmente uma sequência consenso nativa HERV-K gag e/ou pol, incluindo pelo menos um dos epítomos descritos acima. O peptídeo pode ter menos de 50 resíduos de comprimento, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 ou 45 resíduos de comprimento.

[019] A composição, composição imunogênica ou vacina (doravante designada como “a composição”, a menos que indicado o contrário), de acordo com a invenção, pode compreender mais de um desses peptídeos de HERV-K, especialmente de gag e/ou pol, ou um vetor de expressão que induz a expressão *in vivo* de mais de um desses peptídeos de HERV-K, especialmente de gag e/ou pol, ou vários (mais de um) vetores de expressão, cada um induzindo a expressão *in vivo* de um peptídeo diferente (desses peptídeos) de HERV-K, especialmente de gag e/ou pol.

[020] Em uma forma de realização, o peptídeo (com mais de 9 resíduos) é um fragmento HERV-K nativo compreendendo o epítomo 9-mer e aminoácidos adjacentes no N-terminal e/ou C-terminal formando o peptídeo de um determinado comprimento. Em uma forma de realização, o peptídeo compreende mais de dois epítomos de HERV-K (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítomos revelados).

[021] Em uma forma de realização, o peptídeo (tendo mais de 9 resíduos) é um fragmento HERV-K nativo compreendendo o epítomo 9-mer e aminoácidos adjacentes no N-terminal e/ou C-terminal, e aminoácidos estranhos adicionais formando o peptídeo de um determinado comprimento. Em uma forma de realização, o peptídeo compreende mais de dois epítomos de HERV-K (por

exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítomos revelados).

[022] Em outra forma de realização, toda ou parte da sequência peptídica dos peptídeos contidos na composição ou expressos é estranha a HERV-K. Nesta forma de realização, um peptídeo pode compreender facilmente mais de dois epítomos de HERV-K, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítomos revelados. O comprimento do peptídeo é adequado para compreender o número de epítomos e possíveis aminoácidos adicionais. O peptídeo pode assim ter 9 ou 10 a 69 peptídeo de comprimento ou mais.

[023] De preferência, a composição compreende, ou o vetor induz a expressão de, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos diferentes, cada peptídeo compreendendo ou consistindo em um epítomo diferente consistindo em uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nas sequências FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7).

[024] Em uma forma de realização, a composição compreende, ou o vetor induz a expressão de, pelo menos um peptídeo compreendendo ou consistindo em pelo menos dois epítomos diferentes consistindo em uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nas sequências FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7). Em uma forma de realização, o peptídeo compreende 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos referidos epítomos; ou o vetor de expressão induz a expressão de um peptídeo compreendendo 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos referidos epítomos.

[025] Existem várias soluções para ter os diferentes epítomos representados na composição ou nos produtos de expressão *in vivo* no mesmo paciente. A composição pode compreender, ou o vetor induz a expressão de um

ou mais peptídeos compreendendo um ou mais dos diferentes epítomos do referido grupo, de modo que 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos referidos epítomos FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7), estão presentes na composição ou expressos.

[026] Quando se fala sobre um vetor de expressão que induz a expressão de mais de um peptídeo de acordo com a invenção, é possível ter a composição compreendendo um vetor que induz a expressão de vários peptídeos (em que o peptídeo pode compreender um epítomo do grupo, ou mais de 1, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dos referidos epítomos), ou pelo menos dois vetores de expressão, em que cada um dos vários vetores induz a expressão de pelo menos um peptídeo. Em uma forma de realização, a composição compreende um único vetor ou vários vetores, e o(s) vetor(es) induz(em) a expressão de um ou mais peptídeos e 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos referidos epítomos.

[027] Exemplos de peptídeos 29-mer isolados ou purificados compreendendo epítomos e outros resíduos de aminoácidos gag ou pol, de acordo com a invenção, são:

KSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVSTK (SEQ ID NO: 8),
 TLLDSIAHGHRLIPYDWEILAKSSLSPSQ (SEQ ID NO: 9),
 LAKSSLSPSQFLQFKTWWIDGVQEQRN (SEQ ID NO: 10),
 GPLQPGLPSPAMIPKDWPLLLIIDLKDCF (SEQ ID NO: 11),
KLIDCYTFLQAEVANAGLAIASDKIQTST (SEQ ID NO: 12),
 WIRPTLGIPTYAMSNLFSILRGDSDLNSK (SEQ ID NO: 13), e
 RDVETALIKYSMDDQLNQLFNLLQQTVRK (SEQ ID NO: 14).

[028] Cada um destes peptídeos ou fragmentos 29-mer isolados ou purificados ou 28 a 10 resíduos de aminoácidos, compreendendo um epítomo 9-mer, e sob a forma isolada ou purificada, é um objeto da invenção. O peptídeo

pode ter menos de 29 resíduos de comprimento, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 resíduos dessas sequências SEQ ID NO: 8-14, incluindo o epítopo 9-mer. Curiosamente, as sequências de aminoácidos adicionadas aos epítopos podem compreender, como é o caso dos peptídeos de SEQ ID NO: 8-14, outros epítopos T CD4 e/ou CD8 potenciais. A presente invenção fornece peptídeos compreendendo um epítopo conforme revelado neste documento e “outros aminoácidos” na extremidade C-terminal e/ou N-terminal. Estes outros aminoácidos podem ser sequências gag ou pol como aqui revelado com as sequências 1-16. No entanto, a invenção abrange a variação de aminoácidos no nível desses “outros aminoácidos” dentro dessas sequências gag/pol. Assim, a invenção abrange essas sequências, incluindo as sequências 1-16, em que as sequências de aminoácidos adicionais têm uma porcentagem de identidade com aquelas sequências gag/pol de pelo menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%.

[029] Em uma forma de realização, as composições da invenção compreendem ou expressam o peptídeo da SEQ ID NO: 8, ou o peptídeo da SEQ ID NO: 13, ou ambos os peptídeos da SEQ ID NO: 8 e 13, e 1, 2, 3, 4, 5 dos outros peptídeos de SEQ ID NO: 8-14.

[030] Em uma forma de realização, a composição compreende ainda um adjuvante.

[031] O peptídeo RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2) sob a forma isolada ou purificada é um objeto da invenção.

[032] O peptídeo KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3) sob a forma isolada ou purificada é um objeto da invenção.

[033] O peptídeo YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4) sob a forma isolada ou purificada é um objeto da invenção.

[034] O peptídeo AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5) sob a forma isolada ou purificada é um objeto da invenção.

[035] O peptídeo YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6) sob a forma isolada ou purificada é um objeto da invenção.

[036] O peptídeo SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7) sob a forma isolada ou purificada é um objeto da invenção.

[037] Os peptídeos de 10 a 100 aminoácidos compreendendo pelo menos um dos referidos peptídeos de SEQ ID NO: 1-7, sob a forma isolada ou purificada, são um objeto da invenção.

[038] Um peptídeo compreendendo 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítops FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), e SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7), sob forma isolada ou purificada, é um objeto da invenção. O referido peptídeo compreende preferencialmente FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1) e/ou YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6).

[039] Em uma forma de realização, este peptídeo pode compreender 9 a 100, em particular 9 a 70, ou 9 a 50, 40, 30, 25, 20, ou mesmo 10 a 30, 12-25, preferencialmente 14-18, por exemplo, 14, 15, 16, 17 ou 18, resíduos consecutivos, de preferência de HERV-K gag e/ou pol, mais preferencialmente uma sequência consenso nativa de HERV-K gag e/ou pol, incluindo pelo menos um dos epítops acima descritos, com os aminoácidos além do epítopo correspondente da sequência SEQ ID NO: 1-7, sendo os aminoácidos nativos presentes no HERV-K gag ou pol como aqui revelado, e estendendo-se em 5', 3' ou 5' e 3' do referido epítopo. O peptídeo pode ter menos de 50 resíduos de comprimento, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 ou 45 resíduos de comprimento, tipicamente 14, 15, 16, 17 ou 18. Outro objeto da invenção é um vetor de expressão que compreende um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID

NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7), e pelo menos dois deles (especialmente 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 deles), e elementos necessários para deixar a expressão *in vivo* do ácido nucleico (polinucleotídeo) em um paciente.

[040] Um exemplo de polipeptídeo de HERVK-gag compreendendo os 3 epítomos gag:

MGQTKSKIKSKYASYYLSFIKILLKRGGVKVSTKNLIKLFQIIEQFCP
 WFPEQGTLDLKDWSQKETEGHLHCEYVAEPVMAQSTQNVNDYNQLQEVIYPET
 LKLEESKPRGTSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRP
 PPESQYGYPGMPPAPQGRAPYPQPPTRRLNPTAPPSRQGSKLHEIAQEGER
 PTVEARYKSFSIKKLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLLIPYDWEILA
 KSSLSPSQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTIS
 QQALMQNEAIEQVRAICLRAWEKIQDPSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKAR
 KVIVELMAYENANPECQSAIKPLKGKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAML
 MAQAITGVVLGGQVRTFGRKCYNCGQIGHLLKKNCPVLNKQNITIQATTTGREGP
 PDLCNEQRGQPQAPQQTGAFPIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYN
 NCPPP (SEQ ID NO: 15).

[041] Um exemplo de polipeptídeo de HERVK-pol compreendendo os 4 epítomos pol:

NKSRKRRNRESLLGAATVEPPKPIPLTWKTEKPVWVNQWPLPK
 QKLEALHLLANEQLEKGHIEPSFSPWNSPVFVIQKKSGKWRMLTDLRAVNAVI
 QPMGPLQPGLPSPAMIPKDWPLIIIDLKDCFFTIPLAEQDCEKFAFTIPAINNKEP
 ATRFQWKVLPQGMLNSPTICQTFVGRALQPVREKFSDCYIIHCIDDILCAAETK
DKLIDCYTFLQAEVANAGLAIASDKIQTSTPFHYLGMQIENRKIKPQKIEIRKDTL
 KTLNDFQKLLGDINWIRPTLGIPTYYAMSNLFSILRGSDLSNSKRMLTPEATKEIK
 LVEEKIQAQINRIDPLAPLQLLIFATAHSPTGIIIQNTDLVEWSFLPHSTVKTFTL
 YLDQIATLIGQTRLRIIKLCGNPDKIVVLTKEQVRQAFINSGAWKIGLANFVGII

DNHYPKTKIFQLKLTWILPKITRREPLENALTVFTDGSSNGKAAYTGPKERVI
KTPYQSAQRAELVAVITVLQDFDQPINIISDSAYVVQATRDVETALIKYSSMDDQL
NQLFNLLQQTVRKRNFPHYITHIRAHTNLPGLTKANEQADLLVSSALIKAQEL
HALTHVNAAGLKNKFDVTWKQAKDIVQHCTQCQVLHLPTQEAGVNPRGLCPN
ALWQMDVTHVPSFGRLSYVHVTVDYSHFIWATCQSTSHVKKHLLSCFAVMG
VPEKIKTDNGPGYCSKAFQKFLSQWKISHTTGIPYNSQGQAIVERTNRTLKTQL
VKQKEGGDSKCTTPQMQLNLALYTLNFLNIYRNQTTTSAEQHLTGKKSPGEN
QLPVWIPTRHLKFYNEPIRDAKKSTSA (SEQ ID NO: 16).

[042] Os polipeptídeos isolados ou purificados da SEQ ID NO: 15 e 16 são objetos da invenção, assim como as composições, composições imunogênicas e vacinas anticâncer como aqui definidas e compreendendo ou expressando o(s) polipeptídeo(s) de SEQ ID NO: 15 e/ou SEQ ID NO: 16.

[043] Em uma forma de realização, o vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico que codifica um peptídeo de 9 a 100, em particular 9 a 70, ou 9 a 50, 40, 30, 25, 20 aminoácidos (o peptídeo codificado pode ter menos de 50 resíduos de comprimento, tal como 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 ou 45 resíduos de comprimento), compreendendo um epítopo selecionado a partir do grupo consistindo em FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7) e os elementos necessários para a expressão *in vivo* do ácido nucleico (polinucleotídeo) em um paciente. Como mencionado acima, o vetor pode compreender uma sequência de ácido nucleico de modo que o vetor induz a expressão de 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos contendo epítopos, ou induz a expressão de um peptídeo compreendendo 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos referidos epítopos. Além disso, como mencionado acima, o vetor pode compreender um ácido nucleico que codifica um peptídeo compreendendo um ou vários desses epítopos e resíduos de

aminoácidos, além do epítopo em questão, em que os resíduos adicionais podem ser de pol ou gag, ou sendo estranhos a gag ou pol.

[044] O construto ou vetor de expressão pode ser um construto de expressão não viral, tal como um construto de expressão bacteriano, um construto de expressão de DNA ou RNA ou um construto de expressão viral. O construto de expressão pode estar localizado em uma célula apresentadora de antígeno. O construto pode levar à integração do construto de expressão no genoma da célula.

[045] A presente invenção também se refere a essas composições para uso no tratamento de câncer. Os cânceres referidos por este uso podem ser selecionados particularmente (no entanto, sem limitação) a partir desses cânceres: câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo negativo, câncer de ovário, melanoma, sarcoma, teratocarcinoma, câncer de bexiga, câncer de pulmão (carcinoma de pulmão de células não pequenas e carcinoma de pulmão de células pequenas), câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, glioblastoma e leucemias etc., por exemplo, câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo negativo, câncer de ovário, melanoma, sarcoma, teratocarcinoma, câncer de bexiga e leucemias.

[046] O uso pode ter como objetivo a ativação de respostas de células T, resposta de células B ou ambas em pacientes, por exemplo, em pacientes com câncer de mama.

[047] A presente invenção também se refere ao uso de um epítopo 9-mer ou vários dos epítopos 9-mer conforme revelado neste documento, ou de um peptídeo ou vários peptídeos, conforme revelado neste documento, ou de um vetor de expressão ou vários vetores de expressão, como revelado neste documento, ou de uma composição conforme revelada neste documento, para a fabricação de uma composição imunogênica ou vacina para tratar um câncer, conforme revelado neste documento.

[048] Outro objeto da invenção é um método para o tratamento de câncer, compreendendo administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição imunogênica ou vacina, conforme revelado neste documento. Como explicado acima, a composição pode compreender o peptídeo ou peptídeos, ou um ou mais vetores de expressão ou construtos. O método pode compreender a administração da vacina mais de uma vez. A quantidade diária terapêuticamente eficaz de peptídeo (quantidade total de peptídeo ou peptídeos de acordo com a invenção) administrada pode estar na faixa de 0,01 mg a 10 mg, 0,025 mg a 5,0 mg, ou na faixa de 0,025 mg a 1,0 mg.

[049] Outro objeto da invenção é um método para o tratamento de câncer em um paciente compreendendo (a) colocar linfócitos T citotóxicos (CTLs), de um paciente em necessidade de tratamento de câncer, em contato com uma composição ou composição imunogênica de acordo com a invenção; e (b) administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz dos CTLs da etapa (a) ao paciente. O método pode compreender ainda a expansão dos referidos CTL por métodos *ex vivo* ou *in vivo* antes da administração. O contato pode compreender fornecer uma célula apresentadora de antígeno carregada com o(s) peptídeo(s) da invenção ou expressar o(s) referido(s) peptídeo(s) ou polipeptídeo(s) a partir de um construto de expressão. A quantidade terapêuticamente eficaz de células CTL necessária para fornecer benefício terapêutico pode ser de cerca de $0,1 \times 10^4$ a cerca de 5×10^9 células por quilograma de peso do indivíduo. O método pode compreender a realização da etapa (b) mais de uma vez.

[050] A invenção também se refere a um método de preparação de CTLs que compreende o contato de linfócitos T citotóxicos (CTLs), de um paciente em necessidade de tratamento de câncer, com uma composição ou composição imunogênica de acordo com a invenção e, possivelmente, a

expansão dos referidos CTLs *ex vivo*. O contato pode compreender fornecer uma célula apresentadora de antígeno carregada com o(s) peptídeo(s) da invenção ou expressar o(s) referido(s) peptídeo(s) ou polipeptídeo(s) a partir de um construto de expressão.

[051] Uma composição compreendendo tais CTLs em um veículo farmacêutico, preparada como revelado supra, também é um objeto da invenção.

[052] Outro objeto da invenção são células T modificadas com receptor de células T (TCR) que reconhecem peptídeos epítopos da invenção e composições compreendendo tais células T em um veículo farmacêutico. O processo de preparação destas células T é conhecido do técnico no assunto. Pode ser o seguinte (e o processo também é um objeto da invenção): (i) cadeias TCR α e β são isoladas de células T que reconhecem peptídeos epítopos da invenção e inseridas em um vetor (lentivírus ou retrovírus, por exemplo); (ii) células T isoladas do sangue periférico de um paciente ou de um doador são modificadas com esse vetor (lentivírus ou retrovírus, por exemplo) para codificar as sequências de TCR $\alpha\beta$ desejadas; (iii) essas células T modificadas são então expandidas *in vitro* para obter números suficientes para o tratamento e administradas ao paciente. De notar, as sequências de TCR podem ser modificadas para otimização da afinidade de TCR. O método de utilização destas células T, por exemplo, tratamento de câncer, é outro objeto da invenção, e compreende a administração a um indivíduo, em necessidade do mesmo, de uma quantidade eficiente dessas células T. A quantidade terapeuticamente eficaz de células T necessária para fornecer benefício terapêutico pode ser de cerca de $0,1 \times 10^4$ a cerca de 5×10^9 , células por quilograma de peso do indivíduo.

[053] Em uma forma de realização, o câncer é câncer de mama triplo negativo (TNBC), outros cânceres de mama, câncer de ovário, melanoma, sarcoma, teratocarcinoma, câncer de bexiga, câncer de pulmão (carcinoma de

pulmão de células não pequenas e carcinoma de pulmão de células pequenas), câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, glioblastoma e leucemias, por exemplo, câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo negativo, câncer de ovário, melanoma, sarcoma, teratocarcinoma, câncer de bexiga e leucemias.

[054] Os antígenos produzidos ou compreendendo os epítomos, conforme revelado neste documento, também podem ser usados para gerar anticorpos anti-HERV-K e para detectar a presença de anticorpos anti-HERV-K em pacientes com câncer HERV-K+.

[055] Os epítomos e a composição compreendendo pelo menos um peptídeo antigênico, de acordo com a invenção, podem ser usados em métodos de diagnóstico, prognóstico ou imunomonitoramento. Em particular, a presente invenção também se refere a um método para o imunomonitoramento da resposta imunológica em um paciente. A indução de uma resposta adaptativa antitumoral após a imunoterapia (vacina usando os epítomos ou uma composição da invenção ou qualquer outra imunoterapia induzindo resposta adaptativa antitumoral de células T) será avaliada por medição de respostas de células T específicas contra os epítomos de HERV da invenção. A medição pode ser realizada, por exemplo, usando multímeros contendo os epítomos descritos na invenção, diretamente ou após estimulação *ex vivo* com os peptídeos descritos na invenção. A medição da resposta de células T também pode ser realizada após estimulação *ex vivo* com os peptídeos da invenção usando análise FACS, ELISA, ELISPOT ou outro método para detectar a ativação de células T específicas.

[056] Em uma forma de realização, a amostra biológica é sangue, derivado de sangue contendo células circulantes ou linfócitos do tumor. De preferência, o método compreende a determinação de que alguns linfócitos no sangue podem reconhecer especificamente e/ou ser especificamente reativados contra os peptídeos de interesse após estimulação *in vitro*.

[057] Um técnico no assunto saberia vários ensaios para determinar se uma resposta imunológica contra um peptídeo associado a tumor foi gerada. A frase “resposta imunológica” inclui respostas imunológicas celulares e humorais. Vários ensaios de linfócitos B e linfócitos T são bem conhecidos, tais como ELISAs, ensaios de linfócitos T citotóxicos (CTL), tais como ensaios de liberação de cromo, ensaios de proliferação usando linfócitos de sangue periférico (PBL), ensaios de tetrâmero e ensaios de produção de citocinas. Veja Benjamini *et al.* (1991), aqui incorporado por referência.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[058] Os inventores localizaram sequências HERVs no genoma humano e desenvolveram análises de RNAseq de HERVs. Usando dados de RNAseq de 84 cânceres de mama de um banco de dados público, dos quais 42 cânceres de mama triplo negativo (TNBC) e 42 do subtipo ER+, eles compararam esta expressão com RNAseq de amostras de tecido mamário normal, dos quais 51 de área peritumoral e 5 de amostras de redução de mamíferos. 19 HERVs foram especificamente superexpressos em TNBC, a maioria deles pertencente à família HERV-K.

[059] A análise de múltiplos componentes mostrou que os HERVs podem ser usados para caracterizar o subtipo triplo negativo. A expressão de HERVs está associada a níveis mais elevados de OCT4 (POU5F1) e menores de TRIM28 em TNBC, dois fatores que regulam positiva e negativamente, respectivamente, a transcrição de HERVs. Uma ligação com a assinatura EMT também foi observada, que pode estar associada a características de stemness em TNBC. Curiosamente, a expressão de HERVs se correlacionou significativamente com a assinatura transcriptômica de células T e linfócitos citotóxicos, o que pode ser explicado por uma resposta de interferon do tipo I (IFN) e a presença de assinatura de células apresentadoras de antígeno. A assinatura de células T efetoras foi contrabalançada por uma assinatura

imunomoduladora (incluindo pontos de verificação imunológicos negativos e IDO1/2) e células supressoras (incluindo células T regulatórias e MDSCs).

[060] O polimorfismo de HERVs é frequentemente considerado um grande obstáculo para caracterizar a resposta de células T contra um antígeno HERV específico ou para usá-las em uma estratégia de vacinação contra o câncer. Com base na expressão específica de um número limitado de HERVs que caracterizam TNBC, foi feita a hipótese de que pode ser possível identificar regiões comuns dentro das proteínas Gag e Pol compartilhadas entre diferentes HERVs expressos em TNBC e, em seguida, determinar os epítomos de células T presentes nesses domínios. Regiões comuns em Gag e em Pol de vários HERV-K superexpressos em TNBC e contendo ORF intacta para cada proteína foram efetivamente encontradas. Curiosamente, esses domínios compartilhados contêm várias regiões enriquecidas em potenciais ligantes de epítomos fortes para os alelos MHC classe I e II mais frequentes, usando diferentes ferramentas de predição de epítomos (incluindo NetMHC I e II).

[061] Peptídeos 9-mer correspondentes aos epítomos HLA-A2 previstos foram sintetizados e usados para um protocolo *in vitro*, que consiste na estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para induzir uma resposta específica contra os peptídeos de interesse. A presença de células T CD8+ específicas foi avaliada por coloração de múltiplo e a resposta funcional (produção e desgranulação de IFN gama) foi ainda avaliada contra células T2 pulsadas com o peptídeo cognato, mostrando uma ativação específica de células T CD8+ contra peptídeos de HERV feitos de acordo com a invenção. Além disso, a citotoxicidade de células T CD8+ HERV-específicas contra uma linhagem de células tumorais que expressam HERV foi demonstrada usando células T CD8+ específicas do peptídeo SEQ ID NO: 1, confirmando as propriedades antitumorais funcionais das células T geradas por esses peptídeos.

[062] Considerando a expressão aumentada de HERV em células

tumorais e os resultados obtidos, estas conclusões podem ser feitas:

[063] - HERVs são preferencialmente expressos em tumores e 19 subtipos de HERVs caracterizam câncer de mama triplo negativo (TNBC), a maioria deles pertencente à família HERV-K.

[064] - Sequências comuns contendo epítomos de células T podem ser encontradas entre esses 19 subtipos de HERVs.

[065] - Sete peptídeos 9-mer foram identificados como ligantes fortes de HLA-A2 e capazes de induzir uma resposta específica de células T CD8+, com uma resposta citotóxica específica contra células T2 pulsadas com o peptídeo cognato ou contra uma linhagem celular tumoral que expressa HERV: FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6), SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7).

[066] - Os produtos HERVs representam, assim, antígenos tumorais compartilhados, capazes de induzir respostas de células T funcionais. Antígenos tumorais derivados de HERV podem ser usados para o desenvolvimento de vacinas contra o câncer e para monitorar respostas imunológicas adaptativas.

DEFINIÇÕES

[067] As frases “isolado”, “purificado” ou “biologicamente puro” referem-se ao material que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham o material conforme ele é encontrado em seu estado nativo. Assim, os peptídeos isolados de acordo com a invenção, preferencialmente, não contêm materiais normalmente associados aos peptídeos no seu ambiente *in situ*.

[068] “Complexo principal de histocompatibilidade” ou “MHC” é um agrupamento de genes que desempenha um papel no controle das interações celulares responsáveis pelas respostas imunológicas fisiológicas. Em humanos,

o complexo MHC também é conhecido como complexo HLA. Para uma descrição detalhada dos complexos MHC e HLA, “Antígeno de leucócito humano” ou “HLA” é uma proteína do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humana de classe I ou classe II.

[069] A frase “farmaceuticamente aceitável” ou “farmacologicamente aceitável” refere-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reação alérgica ou adversa semelhante quando administradas a um humano. A preparação de uma composição aquosa que contém uma proteína como ingrediente ativo é bem conhecida na técnica. Tipicamente, tais composições são preparadas como injetáveis com um veículo ou excipiente, ou carreador, usual farmaceuticamente aceitável como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção também podem ser preparadas.

[070] Conforme usado neste documento, “veículo, excipiente, carreador” inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores de absorção, tampões, soluções carreadoras, suspensões, coloides e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticas ativas é bem conhecido na técnica.

[071] “Peptídeo imunogênico” significa que o peptídeo, uma vez apresentado ao sistema imunológico em um paciente, pode induzir uma resposta imunológica humoral e/ou celular, e esta resposta é imunogênica, mas não é necessariamente protetora. Isso se aplica a uma “composição imunogênica”.

[072] Uma “resposta imunogênica” refere-se a uma resposta de CTL e/ou HTL a um antígeno derivado de um agente infeccioso ou um antígeno tumoral. A resposta imunológica também pode incluir uma resposta de anticorpo que foi facilitada pela estimulação de células T auxiliares.

[073] Em particular, a composição imunogênica pode induzir a

ativação *in vivo* de células T CD8+ contra os peptídeos de HERV presentes na composição e/ou contra peptídeos ou polipeptídeos de HERV compreendendo epítomos semelhantes aos expressos em células tumorais.

[074] “Composição de vacina” ou “peptídeo vacinal” significa que uma vez administrado a um paciente, respectivamente apresentado ao sistema imunológico de um paciente, a composição ou o peptídeo pode induzir uma resposta imunológica humoral e/ou celular e esta resposta imunológica é protetora.

[075] Uma “resposta imunológica protetora” refere-se a uma resposta de CTL e/ou HTL a um antígeno derivado de um agente infeccioso ou um antígeno tumoral, que previne ou pelo menos interrompe parcialmente os sintomas ou progressão da doença. A resposta imunológica também pode incluir uma resposta de anticorpo que foi facilitada pela estimulação de células T auxiliares.

[076] “Imunogenicidade” significa que o peptídeo ou epítomo, uma vez presente no paciente, especialmente no sangue, tecido ou órgão de um paciente, é capaz de induzir uma resposta imunológica humoral e/ou mediada por células.

[077] Por a composição ou vetor “induz a expressão”, entende-se que compreende um vetor de expressão ou vetores de expressão compreendendo um ácido nucleico, DNA ou RNA, que codifica para o(s) peptídeo(s). O vetor pode ser especialmente um vetor de RNA, um vetor de DNA ou plasmídeo, um vetor viral ou um vetor bacteriano. Pode haver integração de um cassete de expressão no genoma da célula hospedeira ou pode não haver integração, dependendo da natureza do vetor e como isso é bem conhecido do técnico no assunto. O vetor de expressão ou o cassete de expressão podem compreender ainda elementos necessários para a expressão *in vivo* do ácido nucleico (polinucleotídeo) em um paciente. No mínimo, isso consiste em um

códon de iniciação (ATG), um códon de parada e um promotor, bem como uma sequência de poliadenilação para certos vetores, tais como os plasmídeos e vetores virais diferentes de poxvírus. O ATG é colocado a 5' do quadro de leitura e um códon de parada é colocado a 3'. Como se sabe, podem estar presentes outros elementos que permitem o controle da expressão, tais como sequências potenciadoras, sequências estabilizadoras e sequências sinalizadoras que permitem a secreção do peptídeo.

[078] Proteínas ou peptídeos podem ser feitos por qualquer técnica conhecida pelos técnicos no assunto, incluindo a expressão de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos através de técnicas de biologia molecular padrão, o isolamento de proteínas ou peptídeos de fontes naturais ou a síntese química de proteínas ou peptídeos. Os peptídeos sintéticos terão, de forma geral, cerca de até 35 resíduos de comprimento, que é o limite máximo aproximado de comprimento das máquinas automatizadas de síntese de peptídeos, tais como as disponíveis na Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Peptídeos mais longos também podem ser preparados, por exemplo, por meios recombinantes.

[079] Um “epítipo peptídico” ou “epítipo” é um peptídeo que compreende um motivo alelo-específico ou supermotivo de modo que o peptídeo se ligue a uma molécula HLA e induza uma resposta de CTL e/ou HTL. Assim, os peptídeos imunogênicos ou vacinais da invenção, compreendendo pelo menos um “epítipo peptídico” são capazes de se ligar a uma molécula HLA apropriada e, posteriormente, induzir uma resposta de células T citotóxicas, ou uma resposta de células T auxiliares, ao antígeno do qual o imunogênico ou o peptídeo vacinal é derivado.

[080] Está contemplado que os peptídeos da presente invenção podem ainda empregar variantes de sequência de aminoácidos, tais como variantes de substituição, inserção ou deleção. Variantes de deleção não têm um ou mais resíduos da proteína nativa. Mutantes de inserção tipicamente envolvem

a adição de material em um ponto não terminal no polipeptídeo. As substituições são alterações em um aminoácido existente. Essas variantes de sequência podem gerar truncamentos, mutações pontuais e mutações por deslocamento de quadro de leitura. Como é conhecido por um técnico no assunto, os peptídeos sintéticos podem ser gerados por essas mutações.

[081] Também será entendido que as variantes da sequência de aminoácidos podem incluir resíduos adicionais, tais como aminoácidos N- ou C-terminais adicionais, e ainda ser essencialmente conforme estabelecido em uma das sequências aqui reveladas, desde que a sequência atenda aos critérios estabelecidos acima, incluindo a manutenção da atividade biológica.

[082] A seguir está uma discussão baseada na alteração dos aminoácidos de uma proteína, tal como um peptídeo ou proteína da invenção, para criar uma proteína mutada, truncada ou modificada. Por exemplo, certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos no peptídeo ou proteína associada ao tumor, resultando em uma maior resposta imunológica de CTL. Uma vez que é a capacidade interativa e a natureza de uma proteína que define a atividade funcional biológica dessa proteína, certas substituições de aminoácidos podem ser feitas em uma sequência de proteína e em sua sequência de codificação de ácido nucleico subjacente, produzindo assim uma proteína mutada, truncada ou modificada.

[083] Ao fazer essas alterações, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A importância do índice de aminoácidos hidropáticos em conferir função biológica interativa em uma proteína é, de forma geral, entendida na técnica. É aceito que o caráter hidropático relativo do aminoácido contribui para a estrutura secundária da proteína resultante, que por sua vez define a interação da proteína com outras moléculas, por exemplo, enzimas, substratos, receptores, DNA, anticorpos, antígenos e similares.

[084] Também é entendido na técnica que a substituição de

aminoácidos semelhantes pode ser feita efetivamente com base na hidrofiliabilidade. A patente U.S. No. 4.554.101, aqui incorporada por referência, afirma que a maior hidrofiliabilidade média local de uma proteína, conforme governada pela hidrofiliabilidade de seus aminoácidos adjacentes, se correlaciona com uma propriedade biológica da proteína. Os seguintes valores de hidrofiliabilidade foram atribuídos aos resíduos de aminoácidos: aminoácidos básicos: arginina (+3,0), lisina (+3,0) e histidina (-0,5); aminoácidos ácidos: aspartato (+3,0 ± 1), glutamato (+3,0 ± 1), asparagina (+0,2) e glutamina (+0,2); aminoácidos hidrofílicos não iônicos: serina (+0,3), asparagina (+0,2), glutamina (+0,2) e treonina (-0,4), aminoácidos contendo enxofre: cisteína (-1,0) e metionina (-1,3); aminoácidos hidrofóbicos não aromáticos: valina (-1,5), leucina (-1,8), isoleucina (-1,8), prolina (-0,5 ± 1), alanina (-0,5) e glicina (0); aminoácidos hidrofóbicos aromáticos: triptofano (-3,4), fenilalanina (-2,5) e tirosina (-2,3).

[085] Entende-se que um aminoácido pode ser substituído por outro tendo uma hidrofiliabilidade semelhante e produzir uma proteína modificada biologicamente ou imunologicamente. Nessas mudanças, a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliabilidade estão dentro de ± 2 é preferida, aqueles que estão dentro de ± 1 são particularmente preferidos e aqueles dentro de $\pm 0,5$ são ainda mais particularmente preferidos.

[086] Conforme descrito acima, as substituições de aminoácidos, de forma geral, são baseadas na similaridade relativa dos substituintes da cadeia lateral de aminoácidos, por exemplo, sua hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, carga, tamanho e semelhantes. Substituições exemplificativas que levam em consideração as várias características anteriores são bem conhecidas dos técnicos no assunto e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

OUTROS COMPONENTES DA COMPOSIÇÃO

[087] Em outras formas de realização da invenção, a composição

pode compreender um agente imunoestimulador adicional ou ácidos nucleicos que codificam tal agente. Os agentes imunoestimuladores incluem, mas não estão limitados a um antígeno adicional, um imunomodulador, uma célula apresentadora de antígeno ou um adjuvante. Em outras formas de realização, um ou mais dos agentes adicionais são covalentemente ligados ao peptídeo. Outros compostos imunopotenciadores também são contemplados para uso com as composições da invenção, tais como polissacarídeos, incluindo quitosana. Múltiplos (mais de um) epítopos ou peptídeos podem ser reticulados entre si (por exemplo, polimerizados).

[088] A utilização de pequenos peptídeos para imunização ou vacinação pode também requerer tipicamente a conjugação do peptídeo com um peptídeo transportador, polipeptídeo ou proteína que confere imunogenicidade ou imunogenicidade mais forte ao produto final ou o peptídeo ou epítipo alvo. Assim, em uma forma de realização da invenção, cada peptídeo selecionado entre FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6) e SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7), é conjugado ou ligado através de ligação peptídica a um peptídeo, polipeptídeo ou proteína (resíduos de aminoácidos adicionais) que confere imunogenicidade ou imunogenicidade mais forte ao produto conjugado ou peptídeo da invenção.

[089] Em uma forma de realização, o peptídeo ou epítipo FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6) e/ou SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7) está presente em um peptídeo ou polipeptídeo mais longo, especialmente um peptídeo ou polipeptídeo de HERV-K, e de preferência é o peptídeo ou polipeptídeo natural mais longo compreendendo o epítipo no HERV-K do qual o epítipo se origina. Sequências mais longas são assim apresentadas a título de exemplo, com as

sequências SEQ ID NO: 8-14. Em uma variante, vários epítomos fazem parte do mesmo peptídeo mais longo. Também está incluído na invenção conjugar aqueles peptídeos mais longos a um peptídeo, polipeptídeo ou proteína que confere imunogenicidade ou imunogenicidade mais forte ao produto final conjugado.

[090] Na composição imunogênica ou vacina de acordo com a invenção, os peptídeos nela contidos, ou expressos pelo(s) vetor(es), são imunogênicos ou capazes de induzir uma resposta imunológica protetora.

[091] Se a composição ou o peptídeo ou epítopo for usado para diagnóstico ou propósito de ensaio, tal como imunomonitoramento, então o peptídeo ou epítopo pode ser antigênico. Assim, em uma forma de realização da composição, o peptídeo ou epítopo FLQFKTWWI (SEQ ID NO: 1), RLIPYDWEI (SEQ ID NO: 2), KLIDCYTFL (SEQ ID NO: 3), YLSFIKILL (SEQ ID NO: 4), AMIPKDWPL (SEQ ID NO: 5), YAMSNLFSI (SEQ ID NO: 6) e/ou SMDDQLNQL (SEQ ID NO: 7), ou o peptídeo ou epítopo compreendendo tal epítopo, é antigênico. O peptídeo ou epítopo antigênico pode estar em uma forma não conjugada (consiste na sequência de epítopo SEQ ID NO: 1-7) ou pode ser conjugado a um peptídeo ou porção polipeptídica, como aqui revelado.

[092] Um técnico no assunto saberia vários ensaios para determinar se uma resposta imunológica contra um peptídeo associado a tumor foi gerada. A frase “resposta imunológica” inclui respostas imunológicas celulares e humorais. Vários ensaios de linfócitos B e linfócitos T são bem conhecidos, tais como ELISAs, ensaios de linfócitos T citotóxicos (CTL), tais como ensaios de liberação de cromo, ensaios de proliferação usando linfócitos de sangue periférico (PBL), ensaios de tetrâmero e ensaios de produção de citocinas. Veja Benjamini *et al.* (1991), aqui incorporado por referência.

ADJUVANTES

[093] Como também é bem conhecido na técnica, a

imunogenicidade de uma composição de imunogênio particular pode ser aumentada pelo uso de estimuladores não específicos da resposta imunológica, conhecidos como adjuvantes. Alguns adjuvantes afetam a forma como os antígenos são apresentados. Por exemplo, a resposta imunológica é aumentada quando os antígenos proteicos são precipitados pelo alúmen. A emulsificação de antígenos também prolonga a duração da apresentação do antígeno. Adjuvantes de moléculas adequados incluem todos os compostos imunoestimuladores aceitáveis, tais como citocinas, toxinas ou composições sintéticas.

[094] Adjuvantes exemplificativos, muitas vezes preferidos, incluem adjuvante completo de Freund (um estimulador não específico da resposta imunológica contendo *Mycobacterium tuberculosis* morto), adjuvantes incompletos de Freund e adjuvante de hidróxido de alumínio. Outros adjuvantes que também podem ser usados incluem IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferon, GM-CSF, BCG, hidróxido de alumínio, compostos de MDP, tais como thur-MDP e nor-MDP, CGP (MTP-PE), lipídio A e monofosforil-lipídio A (MPL). RIBI, que contém três componentes extraídos de bactérias, MPL, dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS) em uma emulsão de esqualeno/Tween 80 a 2% também é contemplado. Os antígenos MHC podem até ser usados.

[095] Em um aspecto, um efeito adjuvante é alcançado pelo uso de um agente, tal como alúmen, usado em cerca de 0,05 a cerca de 0,1% de solução em solução salina tamponada com fosfato. Alternativamente, o antígeno é feito como uma mistura com polímeros sintéticos de açúcares (Carbopol®) usados como uma solução de cerca de 0,25%. O efeito adjuvante também pode ser feito pela agregação do antígeno na vacina por tratamento térmico com temperaturas variando entre cerca de 70° a cerca de 101 °C por um período de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. Agregação por reativação com anticorpos tratados com pepsina (Fab) para albumina, mistura com célula(s)

bacteriana(s), tais como *C. parvum*, uma endotoxina ou um componente de lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas, emulsão em veículos oleosos fisiologicamente aceitáveis, tais como manida mono-oleato (Aracel A), ou emulsão com uma solução a 20% de um perfluorocarbono (Fluosol-DA®) usado como um substituto de bloco, também podem ser empregados.

[096] Alguns adjuvantes, por exemplo, certas moléculas orgânicas obtidas de bactérias, atuam no hospedeiro em vez de no antígeno. Um exemplo é o dipeptídeo muramil (N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina [MDP]), um peptidoglicano bacteriano. O MDP estimula os macrófagos, mas também parece estimular as células B diretamente.

[097] Em certas formas de realização, hemocianinas e hemoeritinas também podem ser usadas na invenção. O uso de hemocianina de lapa (KLH) é preferido em certas formas de realização, embora outras hemocianinas e hemoeritinas de moluscos e artrópodes possam ser empregadas.

[098] Vários adjuvantes de polissacarídeo também podem ser usados. Por exemplo, foi descrito o uso de vários adjuvantes de polissacarídeos pneumocócicos nas respostas de anticorpos de camundongos. Variedades de poliamina de polissacarídeos são particularmente preferidas, tais como quitina e quitosana, incluindo quitina desacetilada.

[099] Outro grupo de adjuvantes é o grupo dipeptídeo muramil (MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) de peptidoglicanos bacterianos. Derivados de dipeptídeo muramil, tais como o derivado de aminoácido treonil-MDP e o derivado de ácido graxo MTPPE, também são contemplados. A patente U.S. No. 4.950.645 descreve um derivado de dissacarídeo-tripeptídeo lipofílico de dipeptídeo muramil que é descrito para uso em lipossomas artificiais formados a partir de fosfatidil colina e fosfatidil glicerol.

[0100] BCG (bacilo Calmette-Guerin, uma cepa atenuada de

Mycobacterium) e esqueleto da parede celular BCG (CWS) também pode ser usado como adjuvantes, com ou sem dimicolato de trealose. O dimicolato de trealose pode ser usado por si próprio. O BCG é uma ferramenta clínica importante por causa de suas propriedades imunoestimulatórias.

[0101] Agentes anfipáticos e tensoativos, por exemplo, saponina e derivados tais como QS21 (Cambridge Biotech), formam ainda outro grupo de adjuvantes para uso com os imunógenos da presente invenção. Tensoativos de copolímero em bloco não iônico também podem ser empregados. Os oligonucleotídeos são outro grupo útil de adjuvantes. Quil A e lentinen são outros adjuvantes que podem ser usados em certas formas de realização da presente invenção.

[0102] Outro grupo de adjuvantes são as endotoxinas desintoxicadas, tais como a endotoxina desintoxicada refinada da patente US No. 4.866.034.

[0103] Os técnicos no assunto conhecerão os diferentes tipos de adjuvantes que podem ser conjugados a vacinas celulares de acordo com esta invenção e estes incluem alquil lisofosfolídeos (ALP); BCG; e biotina (incluindo derivados biotinizados) entre outros. Certos adjuvantes particularmente contemplados para uso são os ácidos teicóicos de células Gram. Estes incluem os ácidos lipoteicóicos (LTA), ácidos ribitol teicóicos (RTA) e ácido glicerol teicóico (GTA). As formas ativas de suas contrapartes sintéticas também podem ser empregadas em conexão com a invenção.

[0104] Os adjuvantes podem ser codificados por um ácido nucleico (por exemplo, DNA ou RNA). É contemplado que tais adjuvantes também podem ser codificados em um ácido nucleico (por exemplo, um vetor de expressão) que codifica o antígeno, ou em um vetor separado ou outro construto. Os ácidos nucleicos que codificam os adjuvantes podem ser administrados diretamente, como, por exemplo, com lipídios ou lipossomas. Um exemplo de tal adjuvante é

poli-ICLC.

VETORES DE EXPRESSÃO

[0105] Os peptídeos de acordo com a invenção podem ser produzidos *in vivo* no corpo do paciente.

[0106] Uma composição imunogênica ou vacina pode conter RNA ou DNA que codifica um ou mais dos peptídeos descritos acima, de modo que o peptídeo seja gerado *in situ*. O RNA ou o DNA podem estar presentes em qualquer um de uma variedade de sistemas de distribuição conhecidos pelos técnicos no assunto, incluindo sistemas de expressão de ácido nucleico (DNA nu ou plasmídeo, vetor de RNA), sistemas de expressão bacterianos ou virais. Os sistemas de expressão de ácido nucleico adequados contêm as sequências de RNA ou DNA necessárias para a expressão no paciente (tal como um promotor adequado e sinal de terminação). Os sistemas de distribuição bacteriana envolvem a administração de uma bactéria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que induz a expressão de uma porção imunogênica do polipeptídeo em sua superfície celular. Em uma forma de realização preferida, o RNA ou o DNA pode ser introduzido usando um sistema de expressão viral (por exemplo, vaccinia ou outro vírus da varíola, retrovírus ou adenovírus), que pode envolver o uso de um vírus competente para replicação não patogênico (defeituoso). As técnicas para incorporar RNA ou DNA em tais sistemas de expressão são bem conhecidas dos técnicos no assunto. O DNA também pode estar “nu”, conforme descrito, por exemplo, em Ulmer *et al.*, *Science* 259: 1745-1749 (1993), e revisado por Cohen, *Science* 259: 1691-1692 (1993). A absorção de DNA nu pode ser aumentada revestindo o DNA em grânulos biodegradáveis, que são transportados de forma eficiente para as células.

[0107] Os vetores preferidos incluem os vetores de DNA, os vetores de RNA, os vetores virais, tais como retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados, poxvírus, tais como vírus vaccinia e poxvírus atenuados, tais

como Ankara (MVA), NYVAC, ALVAC, TROVAC, outros vetores virais, tais como vírus sindbis, citomegalovírus e vírus herpes simplex, e os vetores bacterianos.

[0108] O termo “expressão” é utilizado de acordo com a invenção no seu significado mais geral e compreende a produção de RNA e/ou peptídeos ou polipeptídeos, por exemplo, por transcrição e/ou tradução. No que diz respeito ao RNA, o termo “expressão” ou “tradução” refere-se em particular à produção de peptídeos ou polipeptídeos. Também compreende a expressão parcial de ácidos nucleicos. Além disso, a expressão pode ser transitória ou estável.

[0109] Existem várias maneiras pelas quais os vetores de expressão podem ser introduzidos nas células. Em certas formas de realização da invenção, o vetor de expressão compreende um vírus ou vetor modificado derivado de um genoma viral. A capacidade de certos vírus de entrar nas células por meio de endocitose mediada por receptor, de se integrar ao genoma da célula hospedeira e expressar genes virais de maneira estável e eficiente, os tornou candidatos atraentes para a transferência de genes estranhos para células de mamíferos. Os primeiros vírus usados como vetores genéticos foram os vírus de DNA, incluindo os papovavírus (vírus símio 40, papiloma vírus bovino e polioma) e adenovírus.

[0110] Um método particular para entrega do ácido nucleico envolve o uso de um vetor de expressão de adenovírus. Embora os vetores de adenovírus sejam conhecidos por terem uma baixa capacidade de integração no DNA genômico, essa característica é contrabalançada pela alta eficiência de transferência de genes proporcionada por esses vetores. “Vetor de expressão de adenovírus” destina-se a incluir aqueles construtos contendo sequências de adenovírus suficientes para (a) suportar o empacotamento do construto e (b) para finalmente expressar um tecido ou construto célula-específico que foi clonado no mesmo. O conhecimento da organização genética ou adenovírus, um vírus de DNA fita dupla linear de 36 kb, permite a substituição de grandes

pedaços de DNA adenoviral por sequências estranhas de até 7 kb.

[0111] O ácido nucleico pode ser introduzido na célula usando transfecção assistida por adenovírus. Eficiências de transfecção aumentadas foram relatadas em sistemas celulares usando sistemas acoplados a adenovírus (Kelleher e Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994). O vírus adeno-associado (AAV) é um sistema de vetor atraente para uso nas vacinas da presente invenção. O AAV tem uma ampla gama de hospedeiros para infectividade. Os detalhes relativos à geração e uso de vetores rAAV são descritos na patente US 5.139.941 e 4.797.368, cada uma incorporada aqui por referência.

[0112] Os retrovírus são promissores como vetores de entrega de genes em vacinas devido à sua capacidade de integrar seus genes ao genoma do hospedeiro, transferindo uma grande quantidade de material genético estranho, infectando um amplo espectro de espécies e tipos de células e de serem embalados em linhagens celulares especiais. A fim de construir um vetor retroviral, um ácido nucleico (por exemplo, um que codifica um antígeno de interesse) é inserido no genoma viral no lugar de certas sequências virais para produzir um vírus que é deficiente para replicação. Para produzir vírions, é construída uma linhagem celular de empacotamento contendo os genes gag, pol e env, mas sem o LTR e os componentes de empacotamento. Quando um plasmídeo recombinante contendo um cDNA, juntamente com o LTR retroviral e as sequências de empacotamento é introduzido em uma linhagem celular especial (por exemplo, por precipitação com fosfato de cálcio, por exemplo), a sequência de empacotamento permite que o transcrito de RNA do plasmídeo recombinante seja empacotado em partículas virais, que são então secretadas para o meio de cultura. O meio contendo os retrovírus recombinantes é então coletado, opcionalmente concentrado e usado para a transferência de genes.

[0113] Lentivírus são retrovírus complexos que, além dos genes

retrovirais comuns gag, pol e env, contêm outros genes com função regulatória ou estrutural. Os vetores lentivirais são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, as patentes US 6.013.516 e 5.994.136). Alguns exemplos de lentivírus incluem os vírus da imunodeficiência humana: HIV-1, HIV-2 e o vírus da imunodeficiência símia: SIV. Os vetores lentivirais foram gerados pela atenuação múltipla dos genes de virulência do HIV, por exemplo, os genes env, vif, vpr, vpu e nef são deletados, tornando o vetor biologicamente seguro.

[0114] Os vetores lentivirais recombinantes são capazes de infectar células sem divisão e podem ser usados para transferência de genes *in vivo* e *ex vivo* e expressão de sequências de ácido nucleico. Por exemplo, lentivírus recombinante capaz de infectar uma célula sem divisão em que uma célula hospedeira adequada é transfectada com dois ou mais vetores que transportam as funções de empacotamento, nomeadamente gag, pol e env, bem como rev e tat, é descrito na patente U.S. No. 5.994.136, aqui incorporada por referência. Pode-se ter como alvo o vírus recombinante por ligação da proteína do envelope com um anticorpo ou um ligante particular para direcionar para um receptor de um tipo de célula particular. Ao inserir uma sequência (incluindo uma região reguladora) de interesse no vetor viral, juntamente com outro gene que codifica o ligante para um receptor em uma célula-alvo específica, por exemplo, o vetor agora é alvo-específico.

ADMINISTRAÇÃO DE COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA OU VACINA

[0115] Para matar células, inibir o crescimento celular, inibir metástases, diminuir o tamanho do tumor ou do tecido e de outra forma reverter ou reduzir o fenótipo maligno das células tumorais, usando os métodos e composições da presente invenção, se administraria de modo geral (ou expressaria) os peptídeos da invenção para induzir células T que são capazes de reconhecer e matar as células cancerosas direcionadas. As vias de administração irão variar, naturalmente, com a localização e natureza da lesão,

e incluem, por exemplo, intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutânea, percutânea, intratraqueal, intraperitoneal, intratumoral, perfusão, lavagem, injeção direta e administração oral.

[0116] A injeção intratumoral ou injeção na vasculatura tumoral é especificamente contemplada para tumores discretos, sólidos e acessíveis. A administração local, regional ou sistêmica também pode ser apropriada. Para tumores de > 4 cm, o volume a ser administrado será de cerca de 4-10 ml (preferencialmente 10 ml), enquanto para tumores de < 4 cm, um volume de cerca de 1-3 ml será usado (preferencialmente 3 ml). Múltiplas injeções administradas como dose única compreendem volumes de cerca de 0,1 a cerca de 0,5 ml. As partículas virais podem ser vantajosamente contatadas por administração de múltiplas injeções ao tumor, espaçadas em intervalos de aproximadamente 1 cm.

[0117] No caso de intervenção cirúrgica, a presente invenção pode ser usada no pré-operatório, para tornar um tumor inoperável sujeito a ressecção. Alternativamente, a presente invenção pode ser usada no momento da cirurgia e/ou posteriormente, para tratar doença residual ou metastática. Por exemplo, um leito de tumor ressecado pode ser injetado ou perfundido com uma formulação compreendendo um peptídeo associado a tumor, polipeptídeo ou construto que o codifica. A perfusão pode ser continuada após a ressecção, por exemplo, deixando um cateter implantado no local da cirurgia. O tratamento pós-cirúrgico periódico também está previsto.

[0118] A administração contínua também pode ser aplicada quando apropriado, por exemplo, quando um tumor é excisado e o leito do tumor é tratado para eliminar doença microscópica residual.

[0119] A administração por seringa ou cateterização é preferida. Essa perfusão contínua pode ocorrer por um período de cerca de 1-2 horas, a cerca de 2-6 horas, a cerca de 6-12 horas, a cerca de 12-24 horas, a cerca de

1-2 dias, a cerca de 1-2 semanas ou mais após o início do tratamento. De modo geral, a dose da composição terapêutica via perfusão contínua será equivalente à dada por uma única ou múltiplas injeções, ajustada ao longo de um período de tempo durante o qual a perfusão ocorre. É ainda contemplado que a perfusão do membro pode ser usada para administrar composições terapêuticas da presente invenção, particularmente no tratamento de melanomas e sarcomas.

[0120] Os regimes de tratamento também podem variar e geralmente dependem do tipo de tumor, localização do tumor, progressão da doença e saúde e idade do paciente. Obviamente, certos tipos de tumor exigirão um tratamento mais agressivo, enquanto, ao mesmo tempo, certos pacientes não podem tolerar protocolos mais exigentes. O médico será o mais adequado para tomar tais decisões com base na eficácia e toxicidade (se houver) conhecidas das formulações terapêuticas.

[0121] Uma quantidade eficaz do imunogênico farmacêutico ou composição de vacina, de forma geral, é definida como a quantidade suficiente para, perceptivelmente e repetidamente melhorar, reduzir, minimizar ou limitar a extensão da doença ou condição ou sintomas da mesma. Definições mais rigorosas podem ser aplicadas para composições de vacinas, incluindo eliminação, erradicação ou cura de doenças.

[0122] Em certas formas de realização, o tumor a ser tratado pode, pelo menos inicialmente, não ser ressecável. Os tratamentos com construtos virais terapêuticas podem aumentar a ressecabilidade do tumor devido ao encolhimento nas margens ou pela eliminação de certas porções particularmente invasivas. Após os tratamentos, a resseção pode ser possível. Os tratamentos adicionais subsequentes à resseção servirão para eliminar a doença residual microscópica no local do tumor.

[0123] Um curso típico de tratamento, para um tumor primário ou um leito de tumor pós-excisão, envolverá doses múltiplas. A quantidade diária

terapeuticamente eficaz de peptídeo (quantidade total de peptídeo ou peptídeos de acordo com a invenção) administrada pode estar na faixa de 0,01 mg a 10 mg, especialmente 0,025 mg a 5,0 mg, ou na faixa de 0,025 mg a 1,0 mg.

[0124] Os tratamentos podem incluir várias “doses unitárias”. A dose unitária é definida como contendo uma quantidade predeterminada da composição terapêutica. A quantidade a ser administrada e a via e formulação particulares estão dentro da habilidade daqueles nas artes clínicas e podem variar dependendo da natureza da composição, seja como uma composição de peptídeo ou uma composição de vetor de expressão. Uma dose unitária não precisa ser administrada como uma injeção única, mas pode compreender a infusão contínua durante um determinado período de tempo. A dose unitária da presente invenção pode ser convenientemente descrita em termos de unidades formadoras de placas (pfu) para um construto viral. As doses unitárias variam de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu e mais. Alternativamente, dependendo do tipo de vetor e do título atingível, serão distribuídas 1 a 100, 10 a 50, 100-1000, ou até cerca de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , ou 1×10^{15} ou mais partículas virais infecciosas (vp) para o paciente ou para as células do paciente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0125] Figura 1: A. Correlação da expressão dos 19 subtipos de HERV superexpressos em TNBC com assinaturas imunológicas, mostrando uma correlação com a apresentação do antígeno, via citotóxica e imunorregulatória; correlação positiva é indicada por cada ponto (cinza claro ou escuro); B. Como exemplo, correlação da expressão de HERV-K 10 com a assinatura de células T.

[0126] Figura 2: A. Gráficos representativos de coloração de dextrâmero de células T CD8+ sem ou com estimulação por peptídeo CMV pp65

(respectivamente, quadrantes superiores) e sem ou com peptídeo P5 de HERV (SEQ ID NO: 5) (respectivamente, quadrantes inferiores). B. Porcentagem de células T CD8+ dextrâmero positivas no dia 12 sem ou com estimulação com peptídeos de HERV específicos (P1 a P7 - SEQ ID NO: 1 a 7) ou controles em vários PBMCs de doadores.

[0127] Figura 3: A. Gráficos representativos da produção de IFN- γ por células T CD8+ após contato com células T2 pulsadas com controles negativos e positivos (quadrantes superiores) e peptídeos de HERV P1, P2, P3 (SEQ ID NO: 1, 2 e 3) (quadrantes inferiores) B. Porcentagem de células T CD8+ positivas para IFN- γ no dia 12 sem ou com estimulação com peptídeos de HERV específicos (P1, P2 e P3 (SEQ ID NO: 1, 2 e 3) ou controles em vários PBMCs de doadores.

[0128] Figura 4: A. Gráficos representativos de coloração de dextrâmero de células T CD8+ sem ou com estimulação pelo peptídeo CMV pp65 (respectivamente, quadrantes superiores) e sem ou com peptídeo P1 de HERV (SEQ ID NO: 1) (respectivamente, quadrantes inferiores).

[0129] B. Razão de alteração de dobramento entre a porcentagem de células T CD8+ específicas dextrâmero positivas na condição estimulada por peptídeo versus não estimulada (P1 a P7 - SEQ ID NO: 1 a 7) no dia 12 em vários PBMCs de doadores.

[0130] C. Histogramas representativos do número de pontos IFN- γ + e Granzyme- β + após 12 dias de estimulação e após 24h de contato com células T2 pulsadas com o peptídeo cognato.

[0131] Figura 5: A. Gráficos representativos da produção de IFN- γ por células T CD8+ após contato com células T2 pulsadas com controles negativos e positivos (quadrantes superiores) e peptídeos de HERV P1, P2, P3 (SEQ ID NO: 1 a 3) (quadrantes inferiores), no doador a;

[0132] A (continuação). Gráficos representativos da produção de

IFN- γ por células T CD8+ após contato com células T2 pulsadas com controles negativos e positivos (quadrantes superiores) e peptídeos de HERV P4, P5, P6 e P7 (SEQ ID NO: 4 a 7) (quadrantes inferiores) para doador b;

[0133] B. Porcentagem de células T CD8+ positivas para IFN- γ no dia 12 sem ou com estimulação com peptídeos de HERV específicos (P1 a P7 - SEQ ID NO: 1 a 7) ou controles em vários PBMCs de doadores.

[0134] Figura 6: A. Gráficos representativos de coloração de dextrâmero para P1 (SEQ ID NO: 1) após classificação e expansão de células T CD8+ P1 específicas (quadrante direito) e sua contraparte negativa (quadrante esquerdo).

[0135] B. Histogramas representativos do número de pontos IFN- γ + e Granzyme- β +, após 24h de cultura das células T CD8+ específicas P1 (SEQ ID NO: 1) com células T2 pulsadas com P1 ou controle negativo (sem peptídeo carregado).

[0136] C. Curvas representativas de quantificação de morte celular em tempo real em co-culturas da linhagem celular MDA-MB-231 (pulsada ou não com o peptídeo de interesse), com células T CD8+ específicas P1 (SEQ ID NO: 1) ou suas contrapartes negativas.

[0137] D. Histogramas representativos da porcentagem de coloração intracelular de IFN- γ (PE) de células T CD8+ P1 específicas (SEQ ID NO: 1) (em preto) versus sua contraparte negativa (células T CD8+ não específicas, em branco) após 6h de co-cultura com a linhagem celular MDA-MB-231 pulsada ou não com o peptídeo de interesse. A adição de um anticorpo bloqueador de HLA-A2 foi usada como controle.

[0138] Figura 7: A. Esquema representativo de linfócitos infiltrados de tumor (TILs) dextrâmero positivos (quadrantes pretos) encontrados em células T CD8 expandidas a partir de dilacerado de TNBC. P1 a P7 (SEQ ID NO: 1 a 7) representam dextrâmero para os peptídeos 1 a 7, TNBC 1 a 4 representam

4 pacientes diferentes. B. Esquema representativo de TILs dextrâmero positivos (quadrantes pretos) encontrados em células T CD8 expandidas de dilacerado de tumor ovariano. P1 a P7 (SEQ ID NO: 1 a 7) representam dextrâmero para os peptídeos 1 a 7, Ovário 1 a 3 representam 3 pacientes diferentes.

[0139] A invenção será agora descrita usando exemplos não limitativos, referindo-se aos desenhos.

EXEMPLO:

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS HERV

[0140] As sequências de DNA de HERVs de diferentes famílias (incluindo HERV-K, HERV-H, HERV-W, HERV-E e ERV3) foram extraídas do banco de dados Genbank. O BLAST foi utilizado para localizar essas sequências no genoma humano (GRCH37), mantendo a posição com pelo menos 98% de similaridade em pelo menos 85% das sequências consultadas e sem gap. Assim, foram identificadas 66 sequências HERVs funcionais.

ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS HERV EM TNBC

[0141] A expressão de HERVs foi analisada em um banco de dados pré-existente de 84 amostras de câncer de mama contendo 42 TNBC. A comparação foi feita com 56 amostras de animais normais (51 peritumorais e 5 amostras de redução de mamíferos). O RNA foi extraído de biópsias de tumor frescas realizando tratamento com DNase e seleção de poli A. Se apresentar uma qualidade suficiente (número de integridade de RNA > 6,5), as sequências HERVs funcionais estão alinhadas com os dados de RNAseq.

[0142] A análise de múltiplos componentes dos 66 subtipos de retrovírus endógenos humanos (HERV) foi realizada. 42 HERVs são expressos. 19 HERVs caracterizam especificamente o câncer de mama triplo negativo (TNBC) em tecido normal e subtipos ER+: HERVK_10, 17, 22, 7, 6, 21, 25, 11, 20, 16, 23, 1, 5; HERVH_4, 7; e HERV3_1.

SELEÇÃO E SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

[0143] Regiões comuns em Gag e Pol compartilhadas entre os 19 HERVs superexpressos foram identificadas após o alinhamento das leituras em um genoma de referência. Usando diferentes ferramentas de predição de epítipo (NetMHC I e II), potenciais ligantes de epítipos fortes para os alelos MHC I e II mais frequentes foram identificados. Entre eles, 7 ligantes fortes previstos de 9-mer para HLA-A*0201 foram selecionados e sintetizados: 4 peptídeos de Gag e 3 de Pol (tecnologia de peptídeo JPT, Berlim, Alemanha). A identidade dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas pelo vendedor. Pureza > 95% foi esperada e determinada por cromatografia líquida de alto desempenho. Os peptídeos liofilizados foram dissolvidos em água deionizada <5% de DMSO, divididos em alíquotas e conservados a -20 °C até o uso.

[0144] Os peptídeos 29mer GMX (SEQ ID NO: 8-14) contendo o ligante forte de peptídeos 9-mer para MHC de classe I (SEQ ID NO: 1-7), além de sequências laterais de motivos de classe II (10-mer em cada lado, exceto para o peptídeo SEQ ID NO: 12, em que a sequência SEQ ID NO: 5 está no C-terminal) foram identificados e analisados quanto à síntese.

ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DAS CORRELAÇÕES ENTRE A EXPRESSÃO DE HERVs E AS

ASSINATURAS DE CÉLULAS T

[0145] Diferentes assinaturas foram usadas para avaliar as características imunológicas do tumor: contra-assinaturas MCP (ref <http://cit.ligue-cancer.net/?p=1338&lang=en>) para células T, células T CD8, células NK, linfócitos citotóxicos, bem como Fibroblastos, Neutrófilos e Células endoteliais para uma análise de controle; Pacote de estimativa (<http://bioinformatics.mdanderson.org/estimate/index.html>) para ImmuneScore, StromalScore; Imunofenograma15 para células efetoras, imunomoduladores (pontos de verificação imunológicos), células supressoras (células T regulatórias

e MDSCs). Genes específicos também serão avaliados (como OCT4, TRIM28, SETDB1), bem como a assinatura EMT (SSGSEA e assinatura de Jean-Paul Thierry) e assinaturas associadas especificamente ao subtipo tumoral. A correlação entre essas assinaturas e HERVs será analisada usando métodos estatísticos clássicos. A Figura 1A mostra uma correlação significativa entre 19 HERVs e assinaturas imunológicas específicas como assinaturas relacionadas à apresentação de antígeno, citotóxicas ou imunomoduladoras. Como exemplo, a expressão de HERV-K 10 está fortemente correlacionada com a assinatura de células T no câncer de mama (Figura 1B).

CULTURA DE PBMCs PARA ESTIMULAÇÃO ESPECÍFICA DE CD8+ HERV+

[0146] PBMCs de doadores HLA-A2 foram cultivados por 12 dias em meio AIM-V (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 5% de soro humano AB (mistura de 5 doadores de EFS Lyon, filtrada) e 20 UI/ml de IL-2 (PROLEUKIN aldesleucina, Prometheus, Vevey, Suíça) enriquecido com 5µg/ml de R848 (InvivoGen, San Diego, EUA) e 10 µg/ml de Poly-IC (InvivoGen) e o peptídeo de interesse (10 µM). As culturas foram realizadas em uma placa de 96 poços de fundo em U, $1,5 \times 10^5$ células por poço e 20 poços foram realizados para cada condição de peptídeo. 100 µl de meio foram alterados e enriquecidos com R848, Poly-IC, IL-2 e o peptídeo de interesse (peptídeos das sequências SEQ ID NO: 1-7) para atingir a mesma concentração final no dia 3. IL-2 e o peptídeo de interesse foram adicionados no dia 6 e no dia 10 IL-2 apenas. O controle positivo foi cultivado com 0,1 µg/ml de PP65 (tecnologia de peptídeo JPT) no experimento de dextrâmero, um peptídeo CMV que é apresentado pelo MHC classe I e estimula especificamente células T CD8+. Para o experimento de IFN- γ , 0,4 µg/ml de peptídeo CEF (Mabtech) foram usados, consistindo em uma mistura de 23 peptídeos virais restritos de MHC classe I de CMV humano, EBV e vírus influenza que estimulam células T CD8+ a sintetizar preferencialmente IFN- γ .

ENSAIO E CLASSIFICAÇÃO DE DEXTRÂMERO

[0147] No dia 12, as células das mesmas condições foram misturadas em tubos de polipropileno, lavadas com 2 ml de tampão FACS e ressuspensas em tampão FACS. As condições foram coradas com 10 µl do dextrâmero correspondente (Immudex, Copenhagen, Dinamarca) durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. O kit de viabilidade corrigível Zombie Near Infra-Red (NIR) (Zombie NIR, biolegend, Paris, França) foi usado a 1/400 para avaliar a viabilidade. Anticorpos anti CD3 (BV421, Biolegend) e anti CD8 (FITC, Beckman coulter, Brea, EUA) foram então adicionados a cada condição (1/10 no ensaio da Figura 2, 1/25 para a Figura 4) e deixados 20 minutos no escuro a 4 °C. As células foram então lavadas duas vezes com 2 ml de tampão FACS e ressuspensas em 350 µl de tampão FACS até a análise. A análise foi realizada em FACS Fortessa (BD) para discriminar células T HERV CD8+ multímero específicas.

[0148] Os resultados na Figura 2A mostram a população corada por dextrâmero em PBMCs pulsados com peptídeo não específicos (painéis à esquerda) e específicos (painéis à direita). Nos painéis superiores, até 72% das células T CD8+ resultaram positivas após estimulação com o peptídeo pp65 de controle positivo de CMV vs. 2,02% em PBMCs não estimulados (indicando uma possível presença de células T de memória contra CMV devido a infecções anteriores). Curiosamente, PBMCs estimulados com um peptídeo de HERV (por exemplo, SEQ ID NO: 5 no painel inferior) resultaram em 34,2% de células T CD8+ dextrâmero positivas vs. 0,04% na condição não estimulada. Os resultados obtidos em quatro doadores diferentes estão resumidos na Figura 2B.

[0149] Os resultados na Figura 4A mostram a população corada por dextrâmero em PBMCs pulsados com peptídeo não específicos (painéis à esquerda) e específicos (painéis à direita). Nos painéis superiores, até 23,40% das células T CD8+ resultaram positivas após a estimulação com o peptídeo

pp65 de controle positivo de CMV vs. 3,63% em PBMCs não estimulados (indicando uma possível presença de células T de memória contra CMV devido a infecções anteriores). Curiosamente, PBMCs estimulados com um peptídeo de HERV (por exemplo, SEQ ID NO: 1 no painel inferior) resultaram em 0,63% de células T CD8+ dextrâmero positivas vs. 0,091% na condição não estimulada. Os resultados obtidos em 12 doadores diferentes estão resumidos na Figura 4B, mostrando um aumento significativo nas células T CD8+ dextrâmero positivas para P1, P4 e P6 (por exemplo, SEQ ID NO: 1, 4, 6) e ligeiramente para P2 e P3 (por exemplo, SEQ ID NO: 2, 3).

[0150] PBMCs estimulados com peptídeo após a cultura de 12 dias foram usados para realizar um ensaio ELISPOT para IFN- γ e Granzyme- β (Figura 2C). $2 \cdot 10^5$ células por poço foram colocadas em co-cultura com células T2 específicas para o peptídeo de interesse em uma razão de 10: 1. ELISPOT foi revelado após 24h mostrando pontos específicos de IFN- γ e Granzyme- β para P1 e P6 (por exemplo, SEQ ID NO: 1, 6).

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM CONTATO DE CÉLULAS T2

[0151] No dia 12 de cultura de PBMCs, as células T2 foram lavadas em RPMI e ressuspensas em meio AIM-V (Thermo Fisher Scientific). T2 (linhagem celular SD) são uma linhagem celular de linfoblasto deficiente no transportador associado à proteína de processamento de antígeno (TAP) e, portanto, não podem apresentar peptídeos endógenos no MHC de classe I, mas podem ser usados para monitorar a resposta de CTL a um antígeno exógeno de interesse em um ambiente não competitivo. As células T2 foram primeiro pulsadas com o peptídeo de HERV pela adição de 10 $\mu\text{g/ml}$ do peptídeo correspondente a células T2 2M por 2 horas a 37 °C. PBMCs foram misturados e contados e colocados em co-cultura com as células T2 correspondentes a uma concentração respectiva de 1:5 em uma nova placa de 96 poços em U.

[0152] Após 4 horas de incubação a 37 °C, as células da co-cultura

foram lavadas e misturadas em placa de poços em V de acordo com sua condição de coloração em tampão FACS. Zombie NIR (Biolegend) foi usado em 1/400 para avaliar a viabilidade. Anticorpos anti CD3 (PercP, Biolegend) e anti CD8 (FITC, Beckman coulter) foram adicionados 1/10 por condição e deixados por 25 minutos a 4 °C. As células foram lavadas novamente e, em seguida, fixadas com kit de solução de fixação/ permeabilização (Invitrogen, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante por 15 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes em tampão FACS e mantidas a 4 °C.

[0153] No dia 13, as células foram permeabilizadas com o kit de solução de permeabilização (Invitrogen) por 5 minutos em temperatura ambiente e o anticorpo anti IFN- γ (PE, Biolegend) foi adicionado 1/20 à solução por mais 25 minutos a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 350 μ l de tampão FACS antes da análise FACS. A análise foi realizada em FACS Fortessa (BD) para explorar a citotoxicidade específica e desgranulação contra células T2 que expressam sequências HERV.

[0154] Os resultados na Figura 3A mostram a produção de IFN- γ de células T CD8+ estimuladas contra células T2 não pulsadas (P0: painel superior esquerdo), pulsadas com um peptídeo diferente (Pneg: painel central superior) ou com cada peptídeo cognato (controle positivo Ppos: painel superior/ direito, peptídeos de HERV de SEQ ID NO 1, 2 e 3 nos painéis inferiores); os resultados mostram uma produção específica de IFN- γ contra células T2 que expressam peptídeos de HERV. Os resultados de 5 doadores diferentes estão resumidos na Figura 3B, mostrando uma produção de IFN- γ em ~ 10% (em mediana) de células T CD8+ estimuladas com P1 (SEQ ID NO: 1) e ~ 5% (em mediana) de células T CD8+ estimuladas com P2 ou P3 (SEQ ID NO: 2 e 3).

[0155] Os resultados na Figura 5A mostram a produção de IFN- γ de células T CD8+ estimuladas contra células T2 não pulsadas (P0: painel

superior esquerdo em ambos os quadrantes do doador a e do doador b), pulsadas com um peptídeo diferente (Pneg: painel central superior em ambos os quadrantes do doador a e do doador b), ou com cada peptídeo cognato (controle positivo Ppos: painel superior/ direito, peptídeos de HERV de SEQ ID NO 1 a 3 em painéis inferiores para doador a e peptídeos de HERV de SEQ ID NO 4 a 7 em painéis inferiores para doador b); os resultados mostram uma produção específica de IFN- γ contra células T2 que expressam peptídeos de HERV. Os resultados de 12 doadores diferentes estão resumidos na Figura 5B, mostrando uma produção de IFN- γ em um número significativo de células T CD8+ estimuladas com P1 (SEQ ID NO: 1), P2 e P3 (SEQ ID NO: 2 e 3) e em um número moderado de células T CD8+ estimuladas com P6 (SEQ ID NO: 6).

CITOTOXICIDADE DE CÉLULAS T CD8+ P1 ESPECÍFICAS

[0156] As células coradas com dextrâmero foram classificadas por FACS Aria (BD) para separar células T CD8+ peptídeo específicas da contraparte não específica. Ambas as frações foram coletadas e expandidas separadamente em células alimentadoras em placas de 96 poços redondos por 14 dias. A pureza da fração específica versus não específica foi avaliada no dia 14 (Figura 6A) resultando em >90% de células T CD8+ dextrâmero positivas na fração positiva versus <5% na fração negativa. Essas células foram utilizadas para os experimentos de citotoxicidade.

[0157] As células T CD8+ classificadas e expandidas foram avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico por ensaio ELISPOT (Cellular technology limited, CTL). $4 \cdot 10^4$ células T CD8+ P1 específicas foram co-cultivadas com células T2 previamente pulsadas com o peptídeo P1. O número de pontos contados indica uma produção de IFN- γ e Granzyme- β (~ 800 pontos para ambas as citocinas) pelas células T CD8+ P1 específicas contra células alvo pulsadas com o peptídeo cognato em comparação com o controle negativo (Figura 6B). Esses experimentos indicam que essas células são específicas e

funcionais.

[0158] A análise *in silico* da expressão de HERV realizada nas linhagens celulares HMEC (células epiteliais mamárias humanas HLA-A2) e MDA-MB-231 (linhagem celular de câncer de mama triplo negativo HLA-A2), mostrou uma superexpressão de HERVs na linhagem celular MDA-MB-231 em comparação com o HMEC.

[0159] A linhagem celular HLA-A2 TNBC MDA-MB-231 foi usada como alvo para uma análise em tempo real da morte celular induzida por células T CD8+ P1 específicas. $5 \cdot 10^3$ células MDA-MB-231 foram pulsadas ou não com o peptídeo P1 e foram permitidas a adesão em placas de 96 poços. Após a adesão, células T CD8+ P1 ou sua contraparte negativa (controle) foram adicionadas aos poços. A co-cultura foi realizada na presença do corante Cytotox green (Essenbioscience) que entra nas células quando a integridade da membrana plasmática diminui, produzindo um aumento de 100-1000 vezes na fluorescência ao se ligar ao ácido desoxirribonucléico (DNA). A cinética mostra um aumento muito significativo na morte celular quando MDA-MB-231 é co-cultivado com células T P1 específicas em comparação com sua contraparte negativa. Como esperado, um aumento adicional de morte celular foi observado quando as células MDA-MB-231 alvo foram pulsadas com P1 e co-cultivadas com células T P1 específicas (provavelmente devido a um aumento no número de complexos HLA-peptídeo 1 nas células alvo) (Figura 6C).

[0160] Além disso, após 6 horas de co-cultura entre células T CD8+ P1 específicas ou sua contraparte negativa e a linhagem celular TNBC MDA-MB-231 HLA-A2, uma coloração intracelular de IFN- γ foi realizada por FACS (Figura 6D). Os resultados mostram um aumento na porcentagem de células produtoras de IFN- γ quando as células P1 específicas estão na co-cultura em comparação com as co-culturas com a contraparte negativa. Esta porcentagem aumenta ligeiramente quando o MDA-MB-231 é previamente pulsado com P1. O

uso de um anticorpo bloqueador específico anti-HLA-A2 pode reverter esse efeito, demonstrando sua especificidade.

[0161] De modo geral, esses experimentos mostram que as células T CD8+ P1 específicas reconhecem especificamente e são funcionais contra as células alvo que apresentam o peptídeo cognato (células T2 neste experimento) e reconhecem especificamente e matam células tumorais que expressam antígenos derivados de HERV endogenamente (linhagem celular TNBC MDA-MB-231 neste experimento).

COLORAÇÃO DE DEXTRÂMERO DE LINFÓCITOS INFILTRADOS DE TUMOR (TILS) DE TNBC E CÂNCER DE OVÁRIO

[0162] Os tumores foram dilacerados em pequenos pedaços e digeridos com colagenase IV e DNase por 45 minutos. As células obtidas foram ressuspensas em 5% de RPMI de soro humano e distribuídas em 96 poços (5.10^4 células por poço). Microesferas anti-CD3/CD28 (Miltenyi biotech) foram adicionadas ao poço em uma razão de 1:4 com células na presença de IL-2 (F.C. 100 IU/ml). Os TILs foram cultivados durante 14 dias mudando o meio nos dias 5, 7, 9 e 12 e o número de células foi adaptado para ter $0,5 \times 10^6$ células/ml.

[0163] No dia 14, uma coloração de dextrâmero foi realizada (ver parágrafo de ensaio de dextrâmero) para os 7 peptídeos de interesse (P1 a P7 - SEQ ID NO: 1 a 7) e células T CD8+ específicas de dextrâmero foram identificadas por análise FACS em TNBC (Figura 7A) e câncer de ovário (Figura 7B). Os resultados mostram que células T CD8+ específicas para todos os peptídeos de interesse podem ser encontradas em tumores, com algumas variações de acordo com a amostra. Isto confirma a imunogenicidade *in vivo* dos peptídeos e mostra que estes peptídeos podem ser processados naturalmente e podem provocar uma resposta imunológica detectável durante o desenvolvimento do tumor. As células T CD8+ específicas para P1 e P6 são mais frequentemente representadas nos tumores e são peptídeos escolhidos como

base de uma vacina ou composição imunogênica. Esses resultados também militam a favor de uma combinação de vários peptídeos de modo a fornecer uma vacina ou uma composição imunogênica que seja utilizável em pacientes de estado desconhecido em relação a essa reatividade, e preferencialmente compreendendo P1 e/ou P6.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender:
 - 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos, ou um ou mais vetores de expressão que induzem a expressão dos referidos 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 peptídeos *in vivo*, tendo os peptídeos de 9 a 100 resíduos de aminoácidos, cada um compreendendo pelo menos um dos epítomos das sequências SEQ ID NO: 1-7, e cada peptídeo compreendendo pelo menos um epítomo diferente em relação aos outros; ou
 - pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o referido peptídeo tendo de 9 a 100 resíduos de aminoácidos e compreendendo 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos epítomos das sequências SEQ ID NO: 1-7;e um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável.
2. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender ou expressar um ou mais peptídeos compreendendo os epítomos da sequência SEQ ID NO: 1 e/ou 6.
3. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada por compreender ou expressar 3, 4, 5, 6 ou os 7 peptídeos que compreendem os epítomos das sequências SEQ ID NO: 1 a 7.
4. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos peptídeos compreenderem 9 a 100, 70, 50, 40, 30, 25 ou 20 resíduos de aminoácidos e pelo menos um dos referidos epítomos da sequência SEQ ID NO: 1 a 7.
5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por cada peptídeo de 9 a 100, 70, 50, 40, 30, 25 ou 20 resíduos de aminoácidos compreender um epítomo específico da SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

6. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo(s) peptídeo(s) compreender(em) 9 a 100, 70, 50, 40, 30, 25 ou 20 resíduos de aminoácidos consecutivos de um gag ou pol de HERV, incluindo pelo menos um dos referidos epítomos da sequência SEQ ID NO: 1 a 7.

7. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo(s) peptídeo(s) compreender(em) 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, resíduos de aminoácidos consecutivos de um gag ou pol de HERV incluindo pelo menos um dos referidos epítomos da sequência SEQ ID NO: 1 a 7.

8. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos peptídeos serem selecionados a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8-14 e a composição compreender 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 deles.

9. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos peptídeos consistirem em 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 resíduos de aminoácidos consecutivos de sequências SEQ ID NO: 8-14, incluindo o epítomo 9-mer, e a composição compreender 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 deles.

10. VACINA ou composição imunogênica, caracterizada por compreender a composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável e, preferencialmente, um adjuvante.

11. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender linfócitos T citotóxicos (CTLs) de um paciente tratado com um peptídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, ou compreender células T modificadas com receptor de células T (TCR) que reconhecem um peptídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, e um veículo farmacêutico.

12. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada por ser para uso no tratamento de câncer, em particular câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo negativo, câncer de ovário, melanoma, sarcoma, teratocarcinoma, câncer de bexiga, câncer de pulmão (carcinoma de pulmão de células não pequenas e carcinoma de pulmão de células pequenas), câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, glioblastoma e leucemias.

13. PEPTÍDEO ISOLADO, caracterizado por ser selecionado a partir do grupo que consiste nos peptídeos da sequência SEQ ID NO: 2-14, e os peptídeos possuindo 10 a 100, 70, 50, 40, 30, 25 ou 20 aminoácidos e compreendendo pelo menos um dos referidos peptídeos de SEQ ID NO: 2-7.

14. USO DE UMA COMPOSIÇÃO, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado por ser para a fabricação de uma vacina ou composição imunogênica para o tratamento de câncer, em particular câncer de mama, incluindo câncer de mama triplo negativo, câncer de ovário, melanoma, sarcoma, teratocarcinoma, câncer de bexiga, câncer de pulmão (carcinoma de pulmão de células não pequenas e carcinoma de pulmão de células pequenas), câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, glioblastoma e leucemias.

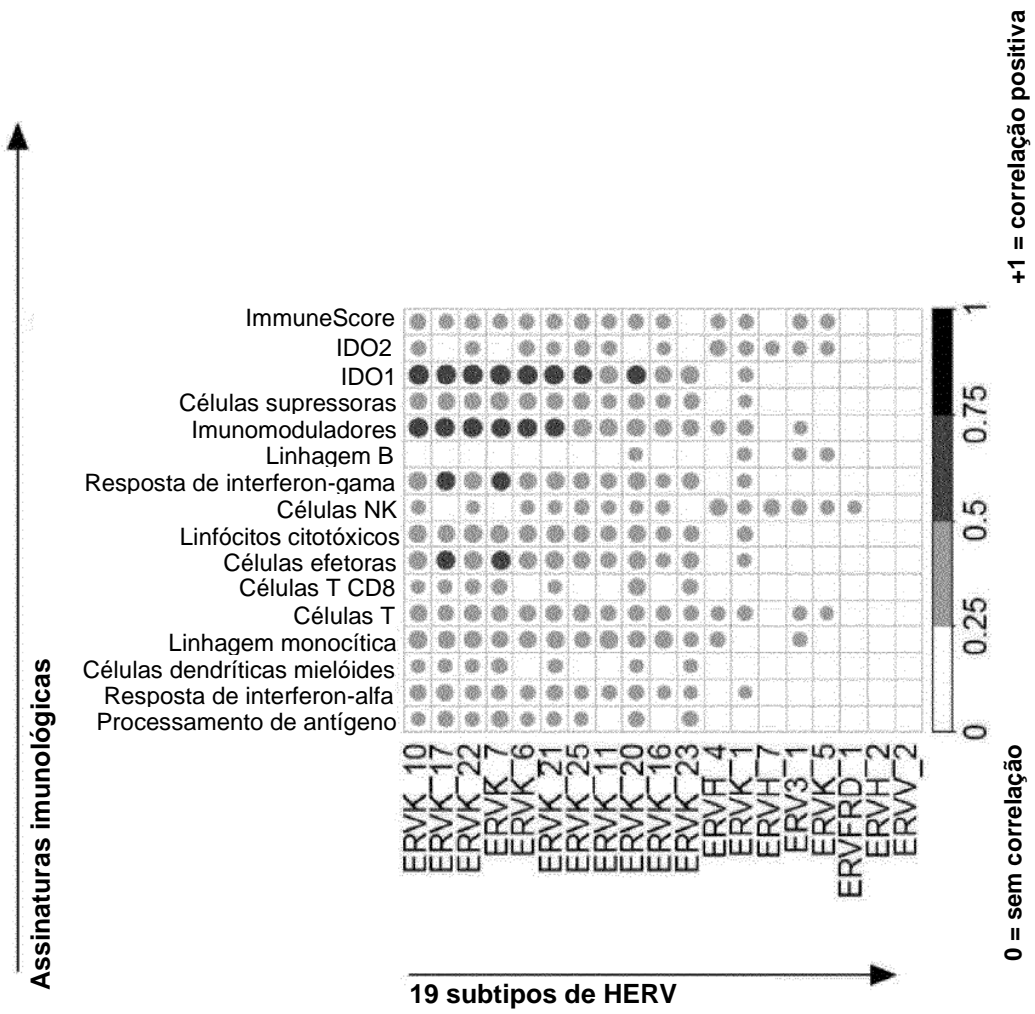


Figura 1 - Continuação

B

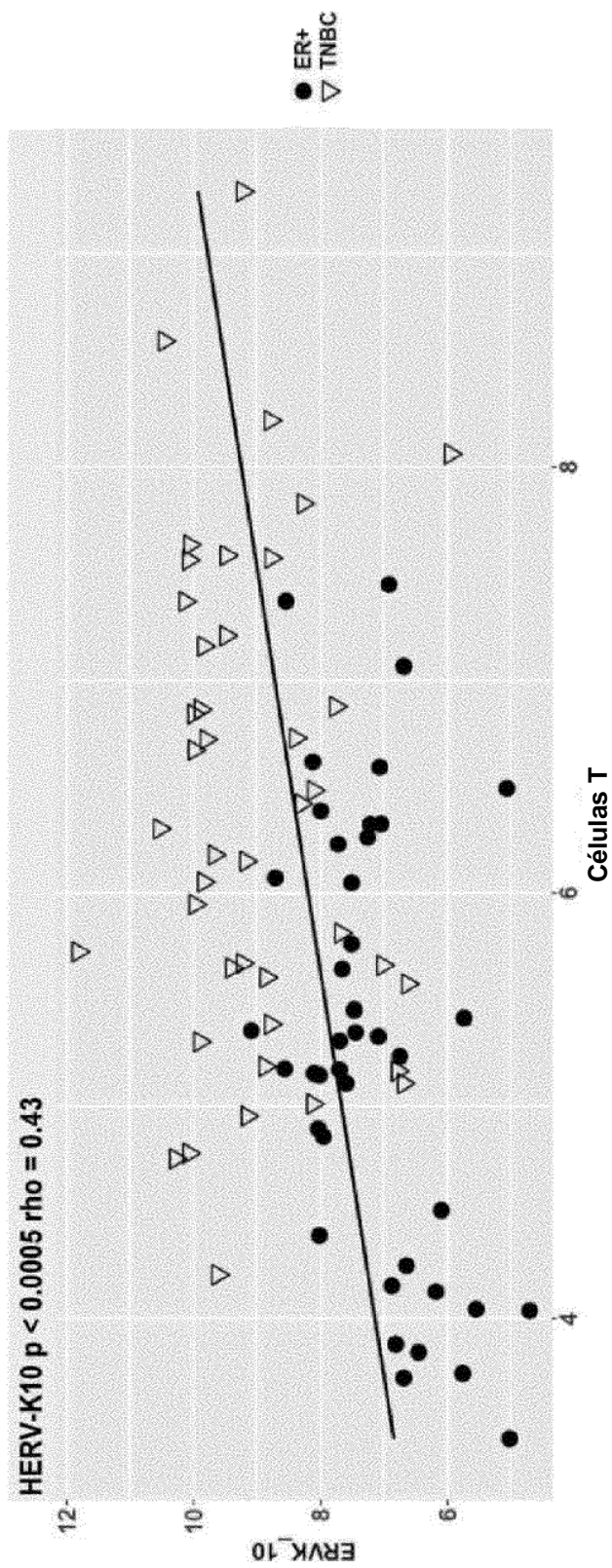


Figura 1 - Final

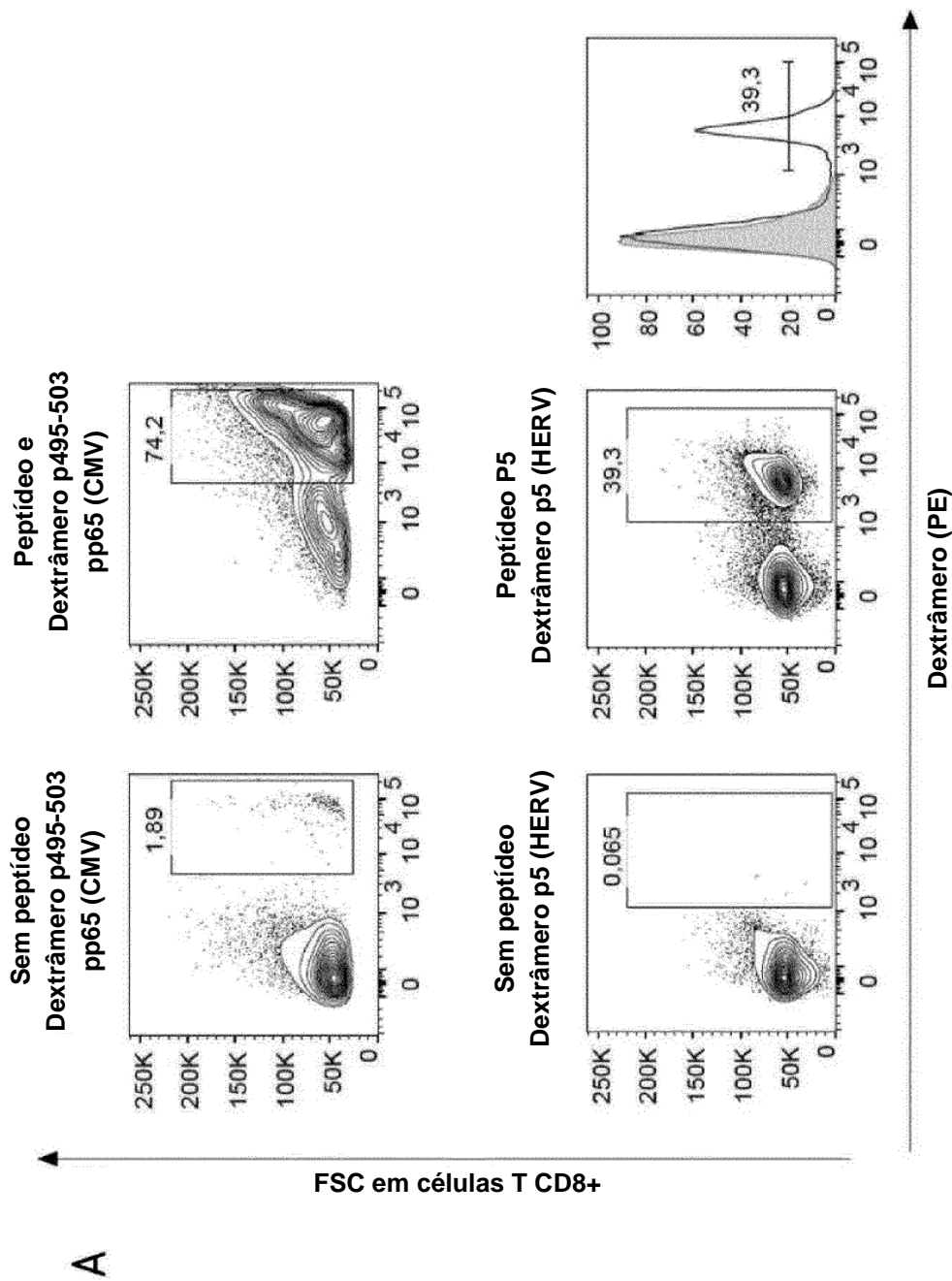


Figura 2 - Continuação

B

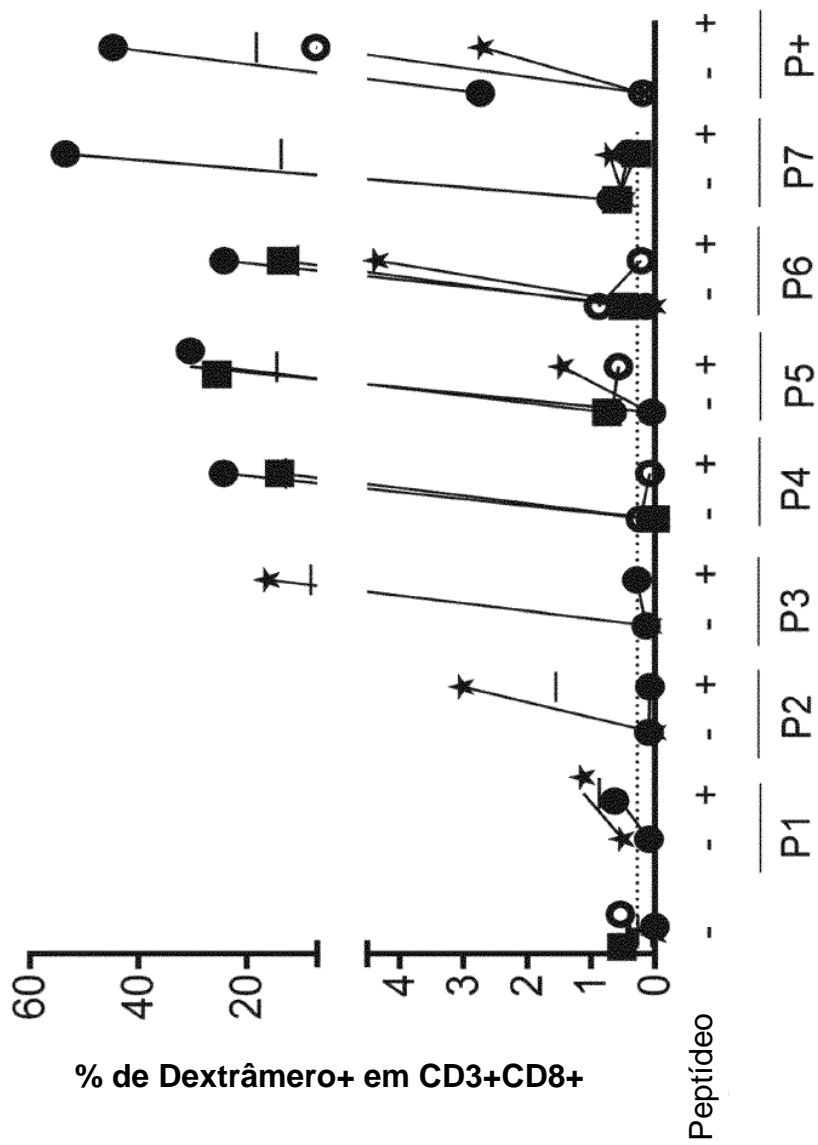
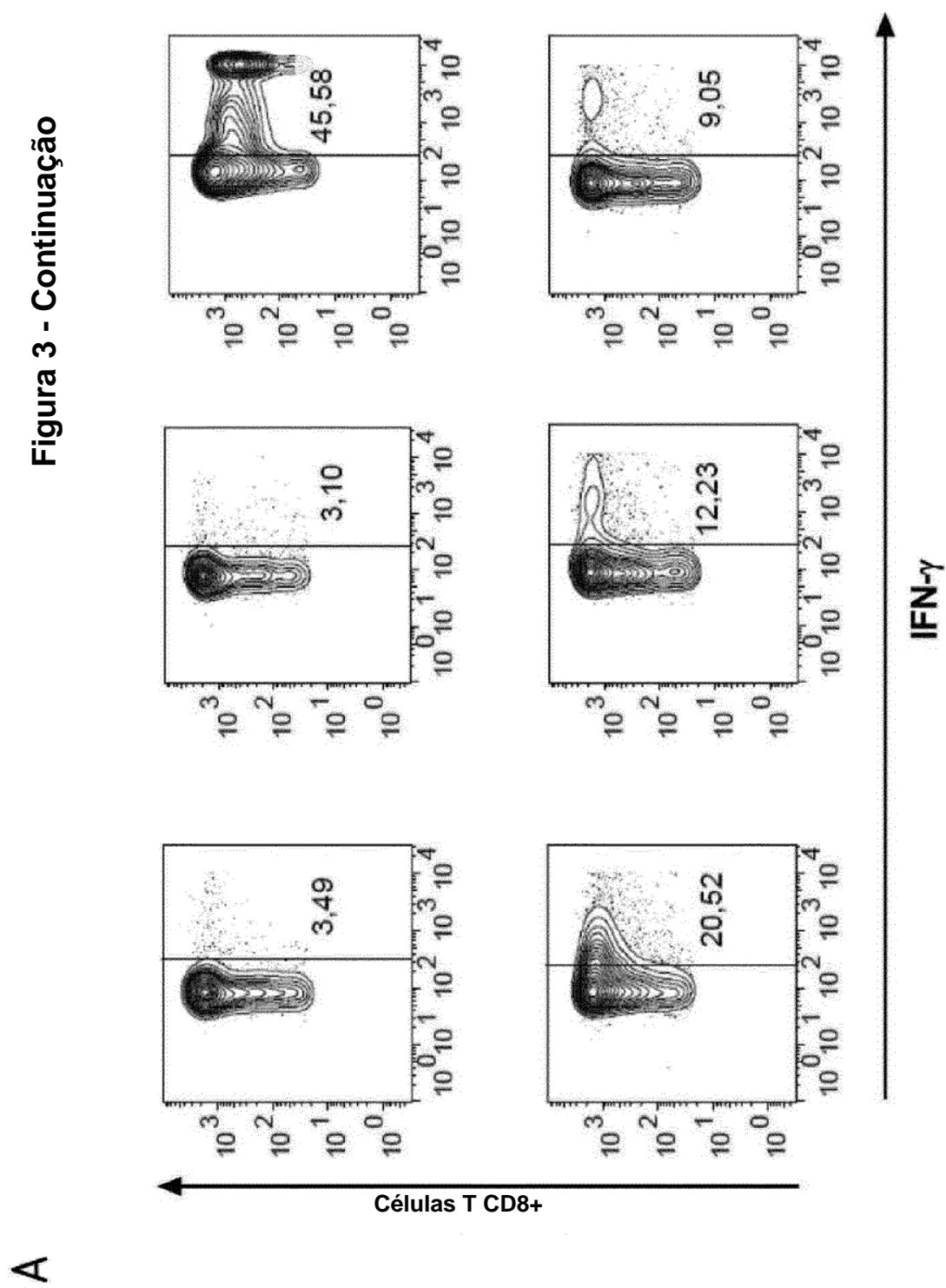


Figura 2 - Final



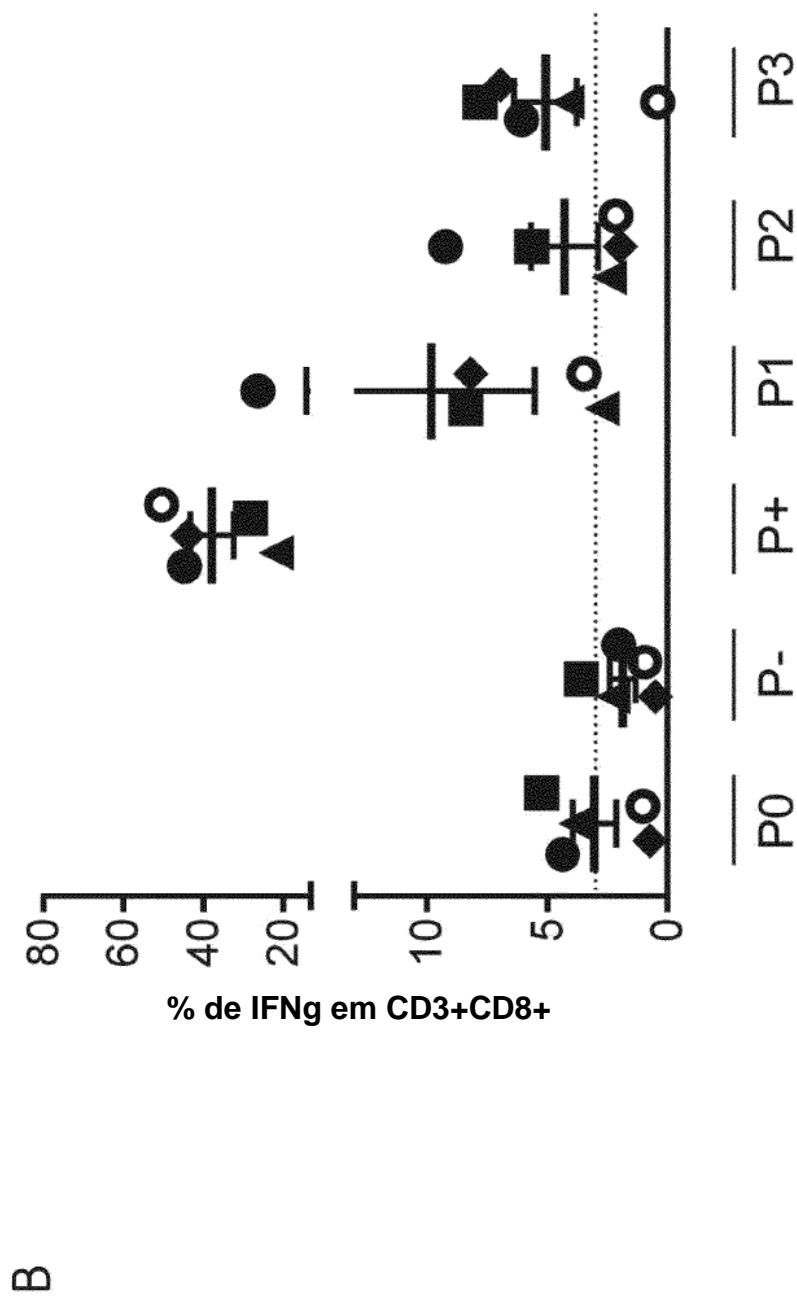


Figura 3 - Final

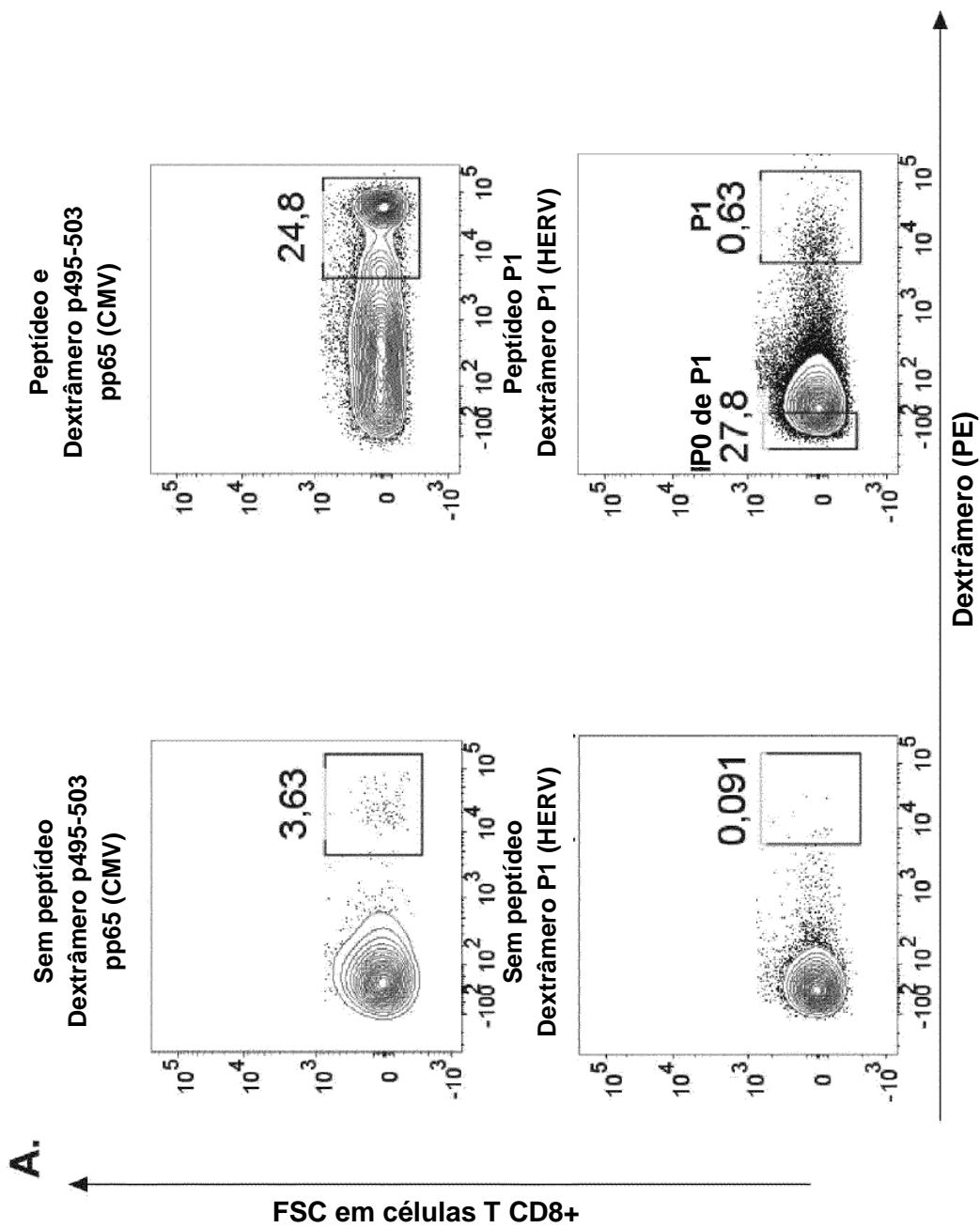


Figura 4 - Continuação

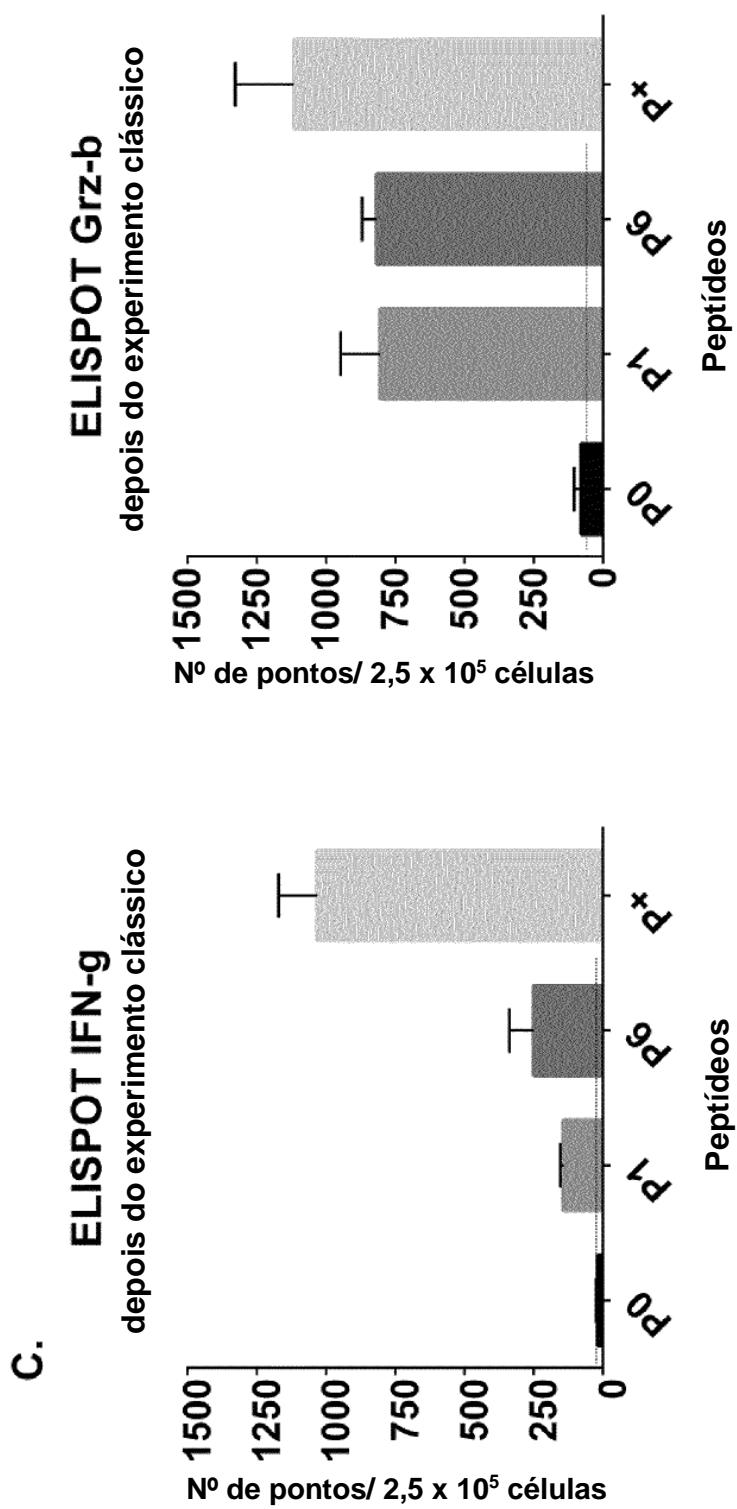


Figura 4 - Final

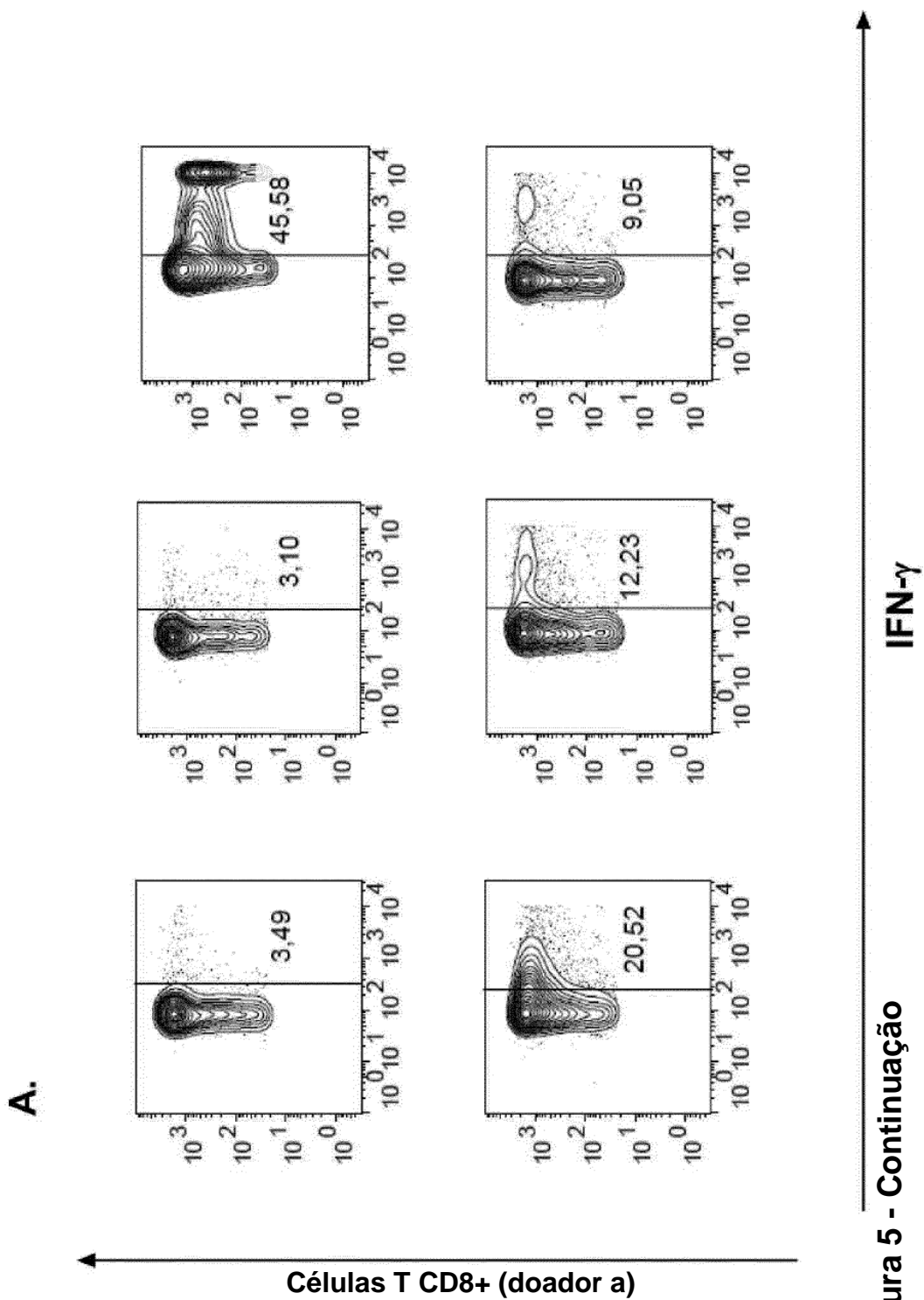


Figura 5 - Continuação

A. (continuação)

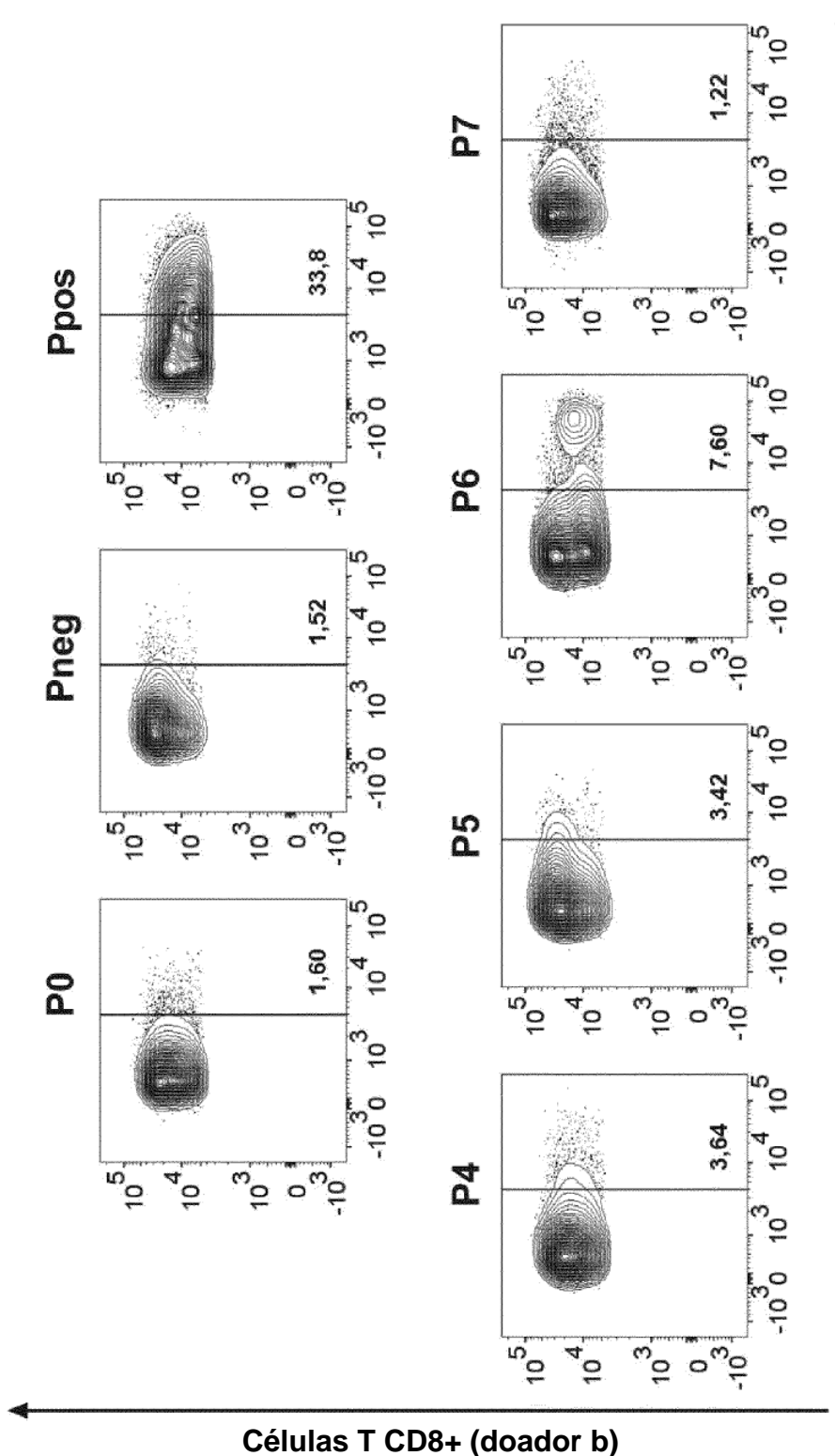
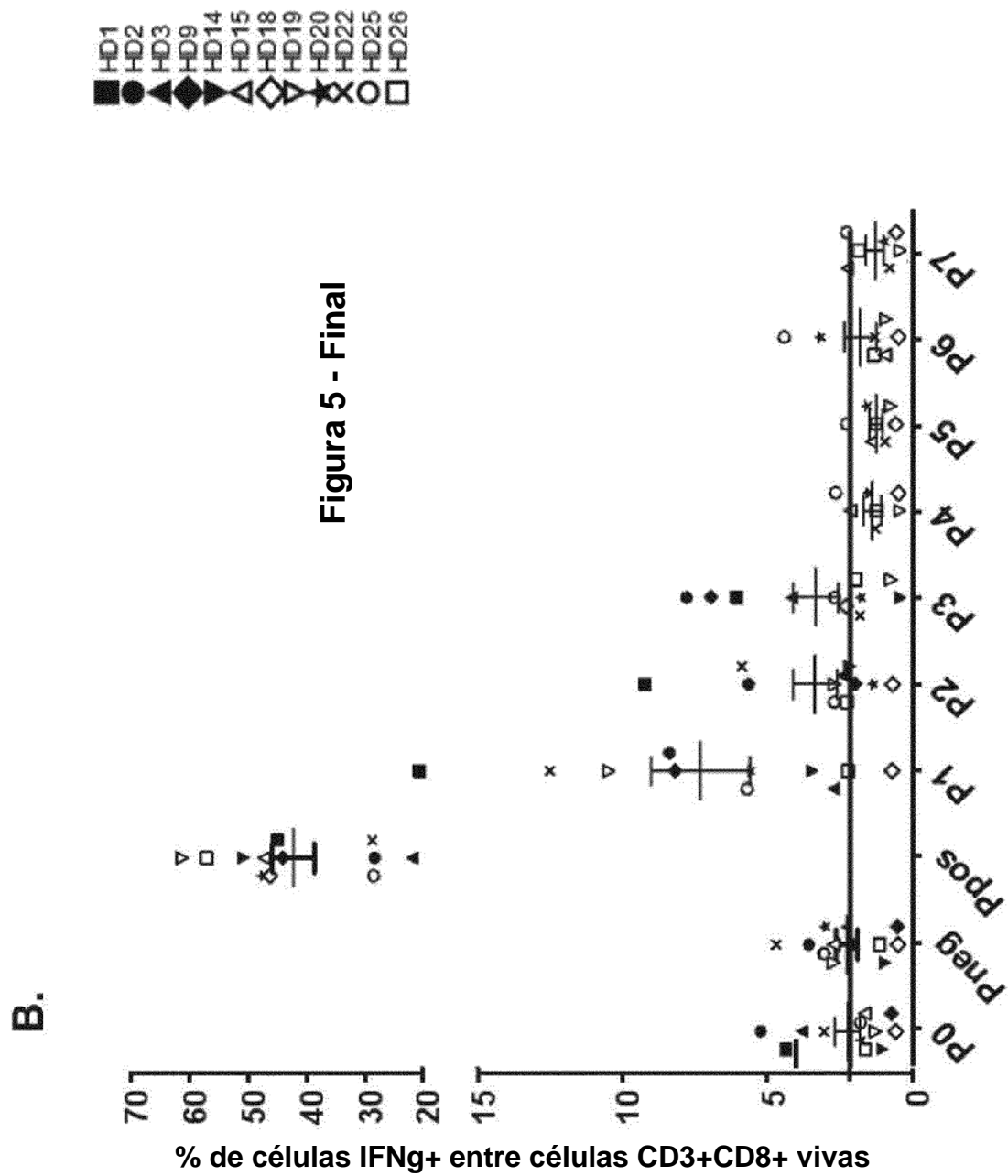


Figura 5 - Continuação

IFN- γ

Células T CD8+ (doador b)



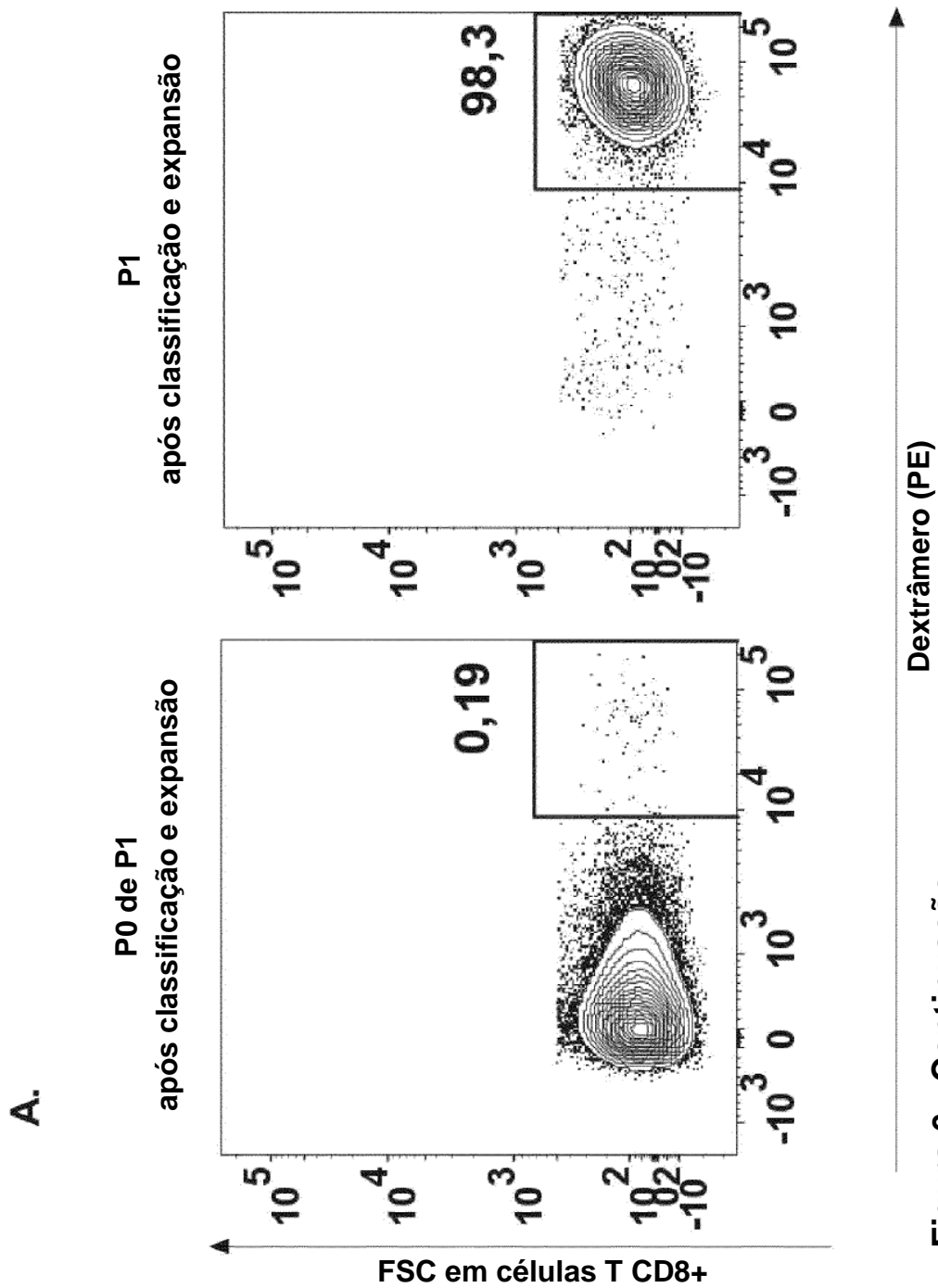


Figura 6 - Continuação

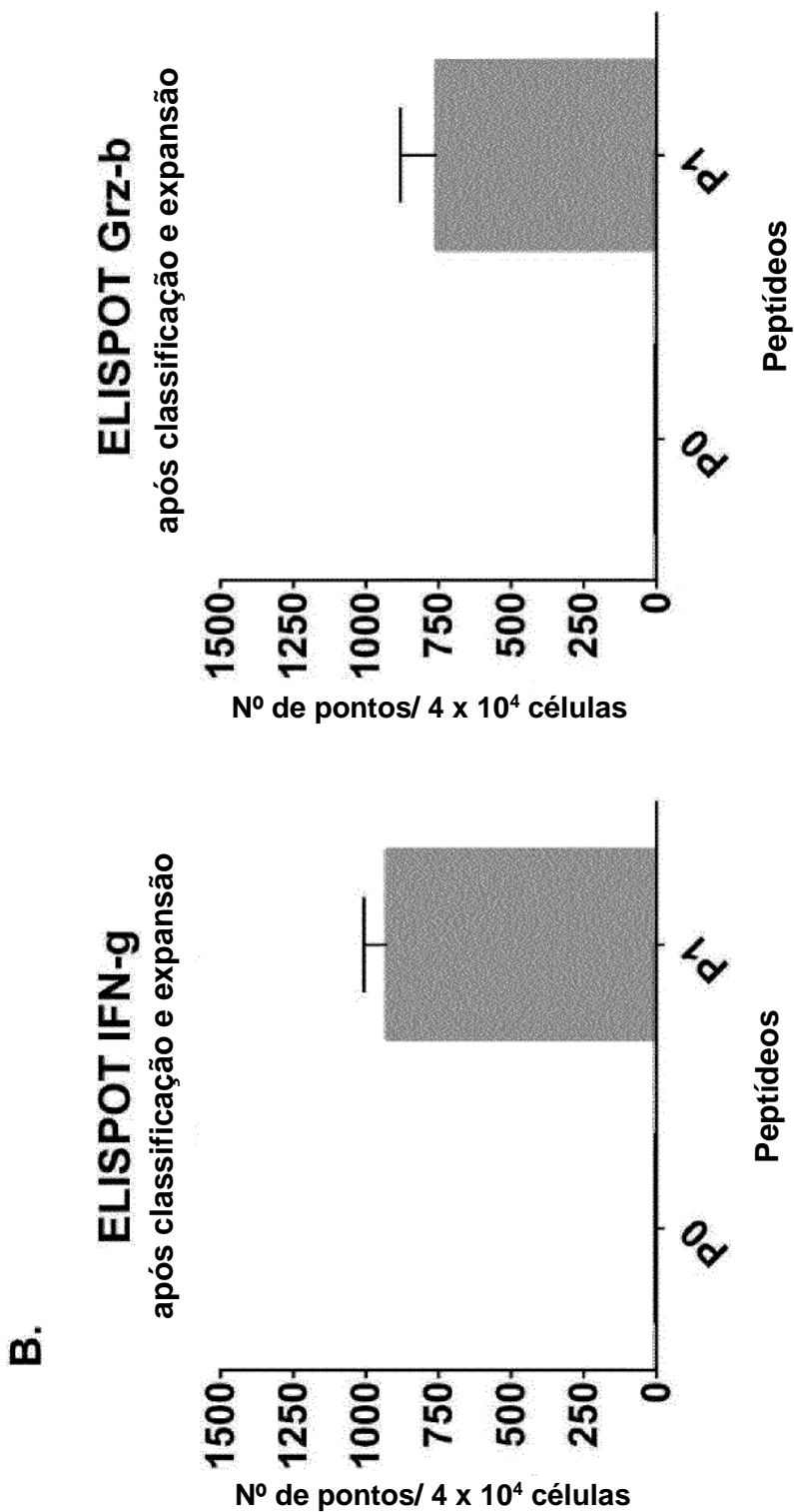


Figura 6 - Continuação

C.

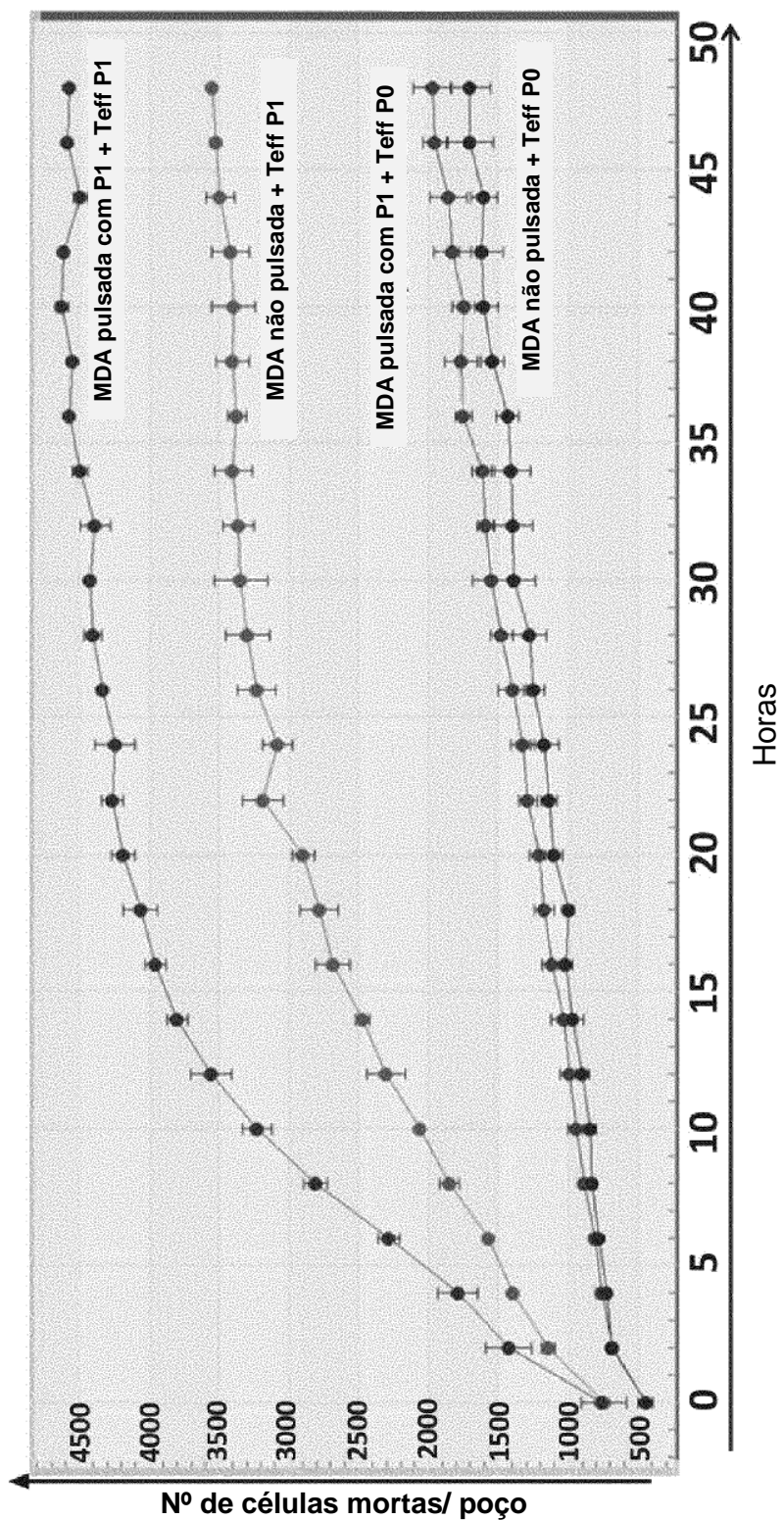


Figura 6 - Continuação

D.

**Coloração intracelular de IFN γ após
co-cultura com MDA-MB-231**

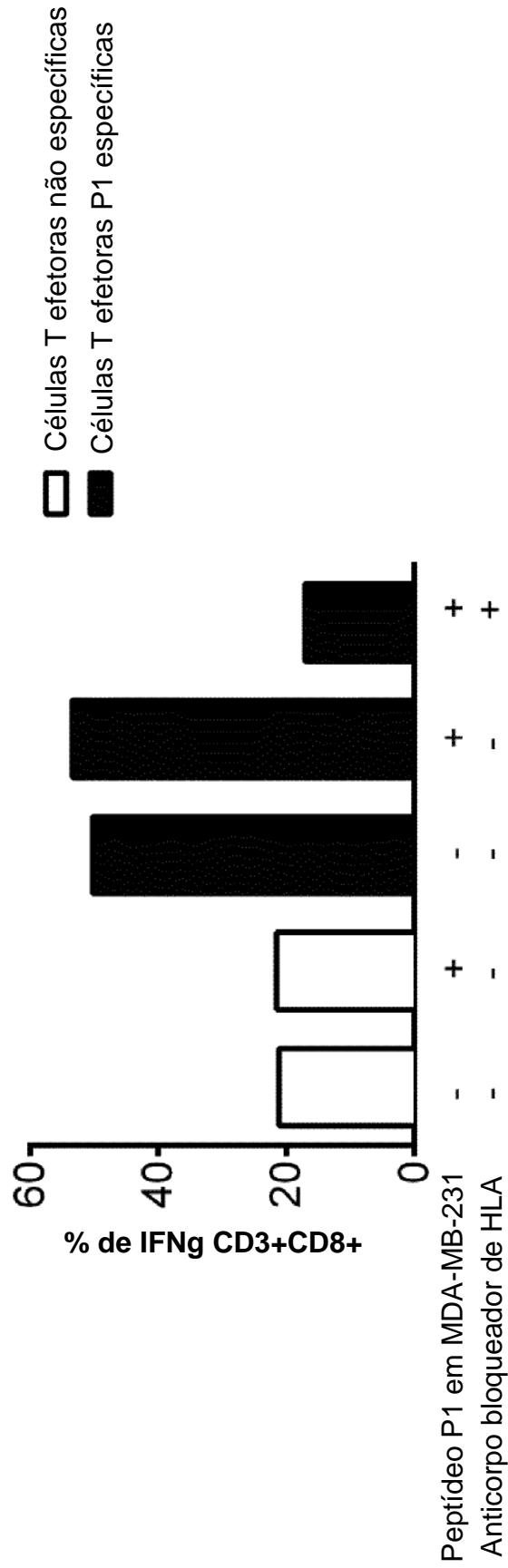


Figura 6 - Final

A.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
TNBC1							
TNBC2							
TNBC3							
TNBC4							Não testado

Figura 7 - Continuação

B.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Ovário 1							
Ovário 2							Não testado
Ovário 3							Não testado

Figura 7 - Final

RESUMO**“COMPOSIÇÕES, VACINA, PEPTÍDEO ISOLADO E USO DE UMA
COMPOSIÇÃO”**

Uma composição ou vacina compreendendo pelo menos um peptídeo, ou um vetor de expressão que induz a expressão do referido pelo menos um peptídeo *in vivo*, o peptídeo consistindo em, ou compreendendo, antígenos derivados de HERV-K compartilhados e um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável. Composição compreendendo linfócitos T citotóxicos (CTLs) de um paciente tratado com tal peptídeo, ou compreendendo células T modificadas com receptor de células T (TCR) que reconhecem tal peptídeo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 0349-0505_Filing_Sequence Listing ESY.TXT
- Data de Geração do Código: 05/03/2021
- Hora de Geração do Código: 16:19:51
- Código de Controle:
 - Campo 1: BAC989D8C7AE0BDA
 - Campo 2: DF1223BA02816A3F