

(11) Número de Publicação: **PT 2440575 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/10 (2014.01) **C07K 14/47** (2014.01)
G01N 33/68 (2014.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.06.09	(73) Titular(es): VAXON BIOTECH 3 RUE DE L'ARRIVÉE 75749 PARIS CEDEX 15 FR
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2012.04.18	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: 2014.11.05 030/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS HLA-B*0702 PARTILHADOS PARA IMUNOTERAPIA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA NOVOS MÉTODOS E MATERIAIS PARA TRATAR EFICIENTEMENTE DOENTES QUE POSSUEM UM FENÓTIPO HLA-B*0702, BASEADO EM PÉPTIDOS QUE REPRESENTAM EPITOPOS PARTILHADOS DE ANTIGÉNIOS TUMORAIS. EM PARTICULAR, A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM PÉPTIDO RESTRINGIDO A HLA-B*0702 QUE PODE DESENCADEAR UMA RESPOSTA CITOTÓXICA CONTRA VÁRIOS ANTIGÉNIOS A PARTIR DE UMA ÚNICA FAMÍLIA MULTIGÉNICA, E PARA VÁRIOS DESSES EPITOPOS.

RESUMO

"IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS HLA-B*0702 PARTILHADOS PARA IMUNOTERAPIA"

A presente invenção proporciona novos métodos e materiais para tratar eficientemente doentes que possuem um fenótipo HLA-B*0702, baseado em péptidos que representam epitopos partilhados de antigénios tumorais. Em particular, a invenção refere-se a um método para identificar um péptido restringido a HLA-B*0702 que pode desencadear uma resposta citotóxica contra vários antigénios a partir de uma única família multigénica, e para vários desses epitopos.

DESCRIÇÃO**"IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS HLA-B*0702 PARTILHADOS PARA IMUNOTERAPIA"**

A presente invenção refere-se ao campo da imunoterapia com péptidos. Em particular, a invenção proporciona novos métodos e materiais para tratar eficientemente doentes que possuem um fenótipo HLA-B*0702, baseado nos péptidos que representam epitopos partilhados de antigénios tumorais.

A imunização por péptidos ou imunoterapia é uma abordagem terapêutica que é atualmente objeto de grande interesse no contexto da prevenção ou tratamento de cancros. O princípio desta terapêutica baseia-se na imunização com péptidos que reproduzem os epitopos T de antigénios tumorais que são reconhecidos por Linfócitos T Citotóxicos (CTLs), que desempenham um papel importante na eliminação de células de cancro que expressam estes antigénios na sua superfície.

Deve ser referido que os CTLs não reconhecem antigénios da proteína total, mas dos seus fragmentos peptídicos, apresentados pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) expressas na superfície de várias células. Estes fragmentos peptídicos cons-

tituem os epitopos T. Os péptidos apresentados pela Classe I do complexo de histocompatibilidade principal (MHC I) possuem geralmente 8 a 11 aminoácidos, e são reconhecidos pelas células CD8⁺ T, que representam o componente principal da resposta citotóxica. Durante o processamento do antigénio, ocorre uma seleção de péptidos, que resulta numa hierarquia de apresentação de péptidos. Os péptidos que são apresentados preferencialmente pelas moléculas de MHC I são denominados imunodominantes enquanto os péptidos que são apresentados fracamente são designados crípticos. Os péptidos imunodominantes apresentam uma elevada afinidade para o MHC I e são imunogénicos enquanto os péptidos crípticos apresentam uma baixa afinidade para MHC I e são não-imunogénicos.

A identificação de epitopos específicos para o tumor, e em particular (considerando o papel essencial da resposta de CD8⁺ na citotoxicidade) daqueles apresentados pelos alelos mais frequentes de MHC I, constitui um passo essencial para o desenvolvimento de composições de imunoterapia anti-tumoral. Atualmente são conhecidos muitos antigénios tumorais; alguns dos epitopos T destes antigénios foram identificados e a eficiência das vacinas baseadas nos péptidos que reproduzem estes epitopos T foi demonstrada em muitos casos (Menez-Jamet e Kosmatopoulos, 2009).

Todavia, a expressão da maioria dos antigénios tumorais é restrita a certos tipos histológicos de tumores,

o que limita a sua utilização clínica. A pesquisa para antigénios tumorais "universais" com uma expressão mais vasta foi intensificada com a identificação de antigénios com funções essenciais para a manutenção do fenótipo oncogénico, e está a ser feito um esforço para identificar epitopos expressos por uma maioria de doentes.

Outra limitação considerável da imunoterapia com péptidos provém do surgimento, em certos doentes, de variantes tumorais (variantes de escape) que já não expressam o antigénio reconhecido pelos Linfócitos T Citotóxicos.

Alguns antigénios tumorais pertencem a famílias de multigenes: na mesma família, existe uma homologia de sequências, que pode resultar na existência de epitopos partilhados comuns a dois ou mais membros da mesma família.

Geralmente, os vários membros da mesma família de antigénios são expressos em vários tipos de tumor; a utilização de um epitopo partilhado por estes antigénios pode tornar possível obter vacinas anti-tumorais com um largo espetro de atividade.

Para além disso, em muitos casos, vários antigénios da mesma família são co-expressos na mesma linha tumoral; uma vez que a probabilidade de perda da expressão de todos estes antigénios é extremamente baixa, a utilização de um epitopo partilhado por estes antigénios pode evitar o surgimento de variantes de escape.

Entre os antigénios tumorais que se sabe pertencerem a uma família de multigenes, deve ser feita uma referência particular aos antigénios das famílias MAGE-A, HER, BAGE ou GAGE.

MAGE-A é uma família de multigenes que consiste em 12 genes homólogos genes (MAGE-A1 to A12) localizados na região q28 do cromossoma X (De Plaen *et al.*, 1994). Entre os membros desta família, MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 e -A12 são expressos fortemente pelos tumores mas não pelos tecidos normais, com a exceção dos testículos e da placenta.

Os antigénios MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 e -A12 estão presentes um largo espetro de tumores de origem histológica muito variada, tais como melanomas, cancros do pulmão, cancros da mama, tumores da cabeça e do pescoço, e sarcomas, mielomas, etc.

Vacinas para o cancro à base de MAGE, tais como MAGE-A3 antigénio Specific Cancer Immunotherapeutic (ASCI) (GlaxoSmithKline) estão presentemente em fase avançada de desenvolvimento com resultados encorajadores. Por exemplo, esta vacina, que se baseia em antigénios tumorais que são apresentados ao Sistema imunitário do doente como proteínas recombinantes em combinação com um sistema adjuvante proprietário GSK, completou com sucesso dois ensaios clínicos no melanoma e em cancro do pulmão de célula pequena.

A expressão de cada antigénio MAGE-A pode variar de um tumor para outro, mas no geral, a vasta maioria dos tumores expressam pelo menos um antigénio MAGE-A.

Apesar da vantagem potencial da utilização de epitopos T partilhados, esta abordagem foi utilizada apenas muito raramente devido à sua raridade nas regiões de tamanho apropriado (pelo menos 8 aminoácidos para um péptido apresentado por MHC I) que são completamente idênticas de um antigénio para outro.

Tanzarella *et al.* (1999) relatou a identificação de um epitopo restrito a HLA-B*3701 partilhado por quatro membros diferentes da família MAGE (MAGE-1, -2, -3, e -6). As CTLs específicas para um péptido compreendem este epitopo (codificado pelos codões 127-136 do gene MAGE-1) foram capazes de reconhecer especificamente células Cos-7 cotransfetadas com HLA-B*3701 e qualquer um destes genes MAGE.

WO 01/42267 revela epitopos MAGE2/3, e vacinas baseadas no epitopo dirigidas a tumores que comportam MAGE2/3.

Os inventores descreveram anteriormente um método para identificar epitopos peptídicos apresentados por uma molécula da classe I de HLA e partilhados por vários antigénios da mesma família multigénica. Este método é caracterizado pelos seguintes passos (EP1 485 719):

a) alinhamento das sequências dos referidos antigénios de modo a identificar em cada um deles uma sequência de 8 a 10 aminoácidos compreendendo pelo menos uma sequência pentapeptídica comum precedida por 3 aminoácidos na extremidade N-terminal e, opcionalmente, seguida por um ou dois aminoácidos na extremidade C-terminal; na verdade, os autores descobriram que uma identidade limitada à sequência de 5 aminoácidos que se estende das posições P4 a P8 do péptido era suficiente.

b) preparar os péptidos correspondentes às sequências identificadas e determinar a afinidade de ligação de cada um dos péptidos para a molécula da classe I de HLA em questão, e a sua imunogenicidade utilizando murganhos transgênicos de CMH-1 humana

c) No caso de um péptido selecionado ser críptico e conseqüentemente não-imunogénico, o método compreende ainda um passo de aumento da sua imunogenicidade.

Utilizando este método, os inventores descreveram um péptido imunogénico definido pela sequência YLEYRQVPV (SEQ ID No: 1), apresentada por HLA-A*0201 comum aos antigénios MAGE-A1, -2, -3, -4, -6, -10 e -12 da família MAGE-A, capaz de induzir CTLs que reconhecem todos os

antigénios MAGE-A, e de lisar células tumorais que expressam pelo menos um antigénio da família MAGE-A. Foi publicado um estudo que descreve este péptido heteroclítico MAGE-A (p248V9) e as suas propriedades imunogénicas por Graff-Dubois *et al.* (*Journal of Immunology*, 2002).

Péptidos imunodominantes têm sido extensivamente constituídos alvos por vacinas tumorais em estudos pré-clínicos e clínicos com resultados decepcionantes (Gross *et al.*, 2004). Na verdade, os antigénios tumorais são frequentemente proteínas de próprio sobre expressas por tumores e expressas a níveis mais baixos pelas células e tecidos normais. O sistema imunitário é incapaz de reagir contra esses antigénios próprios devido ao processo de autotolerância. A autotolerância refere-se principalmente a péptidos imunodominantes, explicando desse modo a incapacidade destes péptidos para induzir a imunidade tumoral.

Os péptidos crípticos estão muito menos envolvidos no processo de autotolerância (Gross *et al.*, 2004) e podem por isso induzir uma imunidade ao tumor eficiente desde que a sua imunogenicidade seja aumentada.

A estratégia normal para aumentar a imunogenicidade de péptidos crípticos, que devido à sua baixa afinidade para MHC I são não-imunogénicos, consiste no aumento da sua afinidade para as moléculas de MHC I através de substituições de aminoácidos. A afinidade do péptido para as moléculas de MHC I dependem principalmente da pre-

sença em posições bem definidas (posições âncora primárias) de resíduos designados "resíduos de âncora primários". Estes resíduos são específicos para o alelo de MHC I. A presença de resíduos âncora primários, embora seja frequentemente necessário, não é suficiente para assegurar uma elevada afinidade para MHC I. Foi demonstrado que os resíduos localizados fora das posições âncora primárias (resíduos âncora secundários) podem exercer um efeito favorável ou desfavorável sobre a afinidade do péptido para o MHC I. A presença destes resíduos âncora secundários torna possível explicar a existência, nos péptidos que possuem os motivos âncora primários, de uma grande variabilidade na afinidade de ligação (Ruppert *et al.*, 1993).

Para além disso, as substituições de aminoácidos destinadas a aumentar a afinidade para a molécula de MHC I deve conservar a antigenicidade desses péptidos otimizados. Os CTL criados contra péptidos otimizados devem na verdade fazer reação cruzada com os péptidos nativos correspondentes, que são aqueles naturalmente apresentados na superfície da célula tumoral.

Os inventores descreveram anteriormente métodos para a seleção de péptidos crípticos em antigénios tumorais e a sua otimização para induzir uma resposta imunitária específica para doentes HLA-A*0201 ((Tourdot *et al.*, 2000), EP 1 309 860) e HLA-B*0702 (WO 2008/010098). Também foi descrito recentemente pelos inventores um método para

selecionar epitopos crípticos estritos para HLA-A*2402, num pedido de patente que ainda não foi publicado. Resumidamente, este método consiste na seleção, num antigénio, um péptido de 8 até 12 aminoácidos possuindo uma tirosina na posição 2, com a condição de o péptido não possuir, simultaneamente, um aminoácido carregado positivamente (lisina ou arginina) na posição 1 e uma leucina ou uma isoleucina ou uma fenilalanina na posição C-terminal. Um tal péptido críptico pode ser então otimizado substituindo o seu resíduo N-terminal por uma arginina ou uma lisina, e/ou substituindo o seu resíduo C-terminal com uma leucina (ou uma isoleucina ou uma fenilalanina).

HLA-B*0702 é uma molécula frequentemente expressa (25% da população). É por isso necessária a identificação e otimização de péptidos tumorais restringidos a HLAB*0702 de modo a desenvolver vacinas para o cancro eficientes para doentes que expressam HLA-B*0702.

De modo a identificar uma vacina para tumor de largo espectro para doentes que expressam HLA-B*0702, os inventores alinharam as sequências dos antigénios de MAGE-A e pesquisaram péptidos possuindo posições âncora 2 e 3 (respetivamente uma prolina e uma arginina ou uma histidina ou uma metionina ou uma lisina) e uma sequência idêntica na região que se estende das posições P4 até P8 do péptido. Não foi encontrada uma sequência correspondente nas regiões MAGE-A conservadas.

Foram então selecionadas sequências como possuindo apenas uma modificação na região de antigenicidade (posição P4 até P8 em 9-meros, e P4 até P9 em 10-meros), e foram otimizados epítopos não imunogénicos como descrito em WO 2008/010098. Surpreendentemente, os inventores demonstraram que um péptido correspondente a um epítopo de HLA-B*0702 críptico modificado para aumentar a sua antigenicidade pode criar uma resposta citotóxica não apenas contra o péptido nativo, mas também contra o epítopo homólogo que está presente noutros antigénios de MAGE-A.

Assim, um primeiro aspeto da presente invenção é um método para identificar um péptido restringido a HLA-B*0702 que pode desencadear uma resposta citotóxica contra pelo menos dois antigénios de uma única família multigénica, compreendendo pelo menos os seguintes passos:

- (i) identificar, nos genes da referida família multigénica, péptidos de 9 ou 10 aminoácidos possuindo um P na posição 2 e um aminoácido selecionado no grupo que consiste em R, K, H e M na posição 3;
- (ii) alinhar as sequências obtidas em (i);
- (iii) identificar, entre os péptidos obtidos no passo (i), um grupo de pelo menos dois péptidos, no qual pelo menos um péptido é tal que a sua região antigénica difere daquela dos outros péptidos do grupo em no máximo um resíduo, em que a referida região antigénica se estende da

posição 4 até à posição 8 num péptido possuindo 9 aminoácidos, e desde a posição 4 até à posição 9 num péptido possuindo 10 aminoácidos.

Um péptido que é tal que a sua região antigénica difere daquela dos outros péptidos do grupo identificado no passo (iii) em no máximo um resíduo será referido de aqui em diante como um "péptido essencialmente partilhado". Esse péptido desencadeia uma resposta citotóxica contra pelo menos dois antigénios da referida família multigénica.

De acordo com formas de realização preferidas do referido método, permitindo o método a identificação de um péptido restringido a HLA-B*0702 que pode desencadear uma resposta citotóxica contra pelo menos três, quatro, cinco, seis, sete ou mais antigénios da referida família multigénica. Este é o caso quando o grupo de péptidos selecionado no passo (iii) compreende péptidos de pelo menos três, quatro, cinco, seis, sete ou mais genes da referida família multigénica, respetivamente.

Numa forma de realização particular do método acima, o grupo de péptidos selecionados no passo (iii) compreende pelo menos dois péptidos que possuem diferentes regiões antigénicas. Neste caso, ilustrado nos exemplos abaixo, pelo menos dois destes péptidos exibem uma e apenas uma diferença nas suas regiões antigénicas.

Numa forma de realização preferida, o método

compreende ainda um passo (iv) de medição da imunogenicidade do péptido selecionado essencialmente partilhado. Este passo será preferencialmente realizado *in vivo* num modelo apropriado, *i.e.*, um modelo que prevê a imunogenicidade do péptido num indivíduo que expressa HLA-B*0702. Um exemplo de um tal modelo apropriado é descrito na parte experimental e consiste num murganho transgénico para HLA-B*0702. Neste modelo, a imunogenicidade de um péptido selecionado é medido por vacinação dos murganhos e testando se os CTLs específicos foram criados, utilizando células humanas expressando HLA-B*0702 e carregados com o péptido como células alvo. No que se segue, um péptido será considerado como um epitopo não imunogénico se nenhum dos murganhos vacinados desenvolver uma resposta imunitária específica contra o péptido testado. Se alguns dos murganhos, mas nem todos, desenvolver uma resposta imunitária específica contra o péptido testado, o péptido é considerado como imunogénico, mas pode ser vantajoso para melhorar ainda mais a sua imunogenicidade.

No caso de um péptido selecionado essencialmente partilhado ser não-imunogénico ou se a sua imunogenicidade tem que ser aumentada, o método compreende ainda um passo de aumentar a sua imunogenicidade, através de um método como o descrito em WO 2008/010098. Em particular, se o péptido selecionado essencialmente partilhado for não-imunogénico e possuir qualquer aminoácido menos P no seu terminal N (especialmente se os três primeiros resíduos do referido epitopo críptico são APR ou APK ou APH ou APM), depois o passo (v) consiste na substituição do resíduo C-

terminal do referido epitopo com uma leucina. No caso do péptido selecionado essencialmente partilhado ser não-imunogénico e possuir um aminoácido selecionado entre L, A, I, V, M, C ou T (especialmente L, A, I, V ou M) no seu terminal C, depois o passo (v) pode ser realizado substituindo o resíduo N-terminal do referido epitopo com uma alanina. Certamente, neste método, a palavra "substituindo" deve ser entendido como obtendo um péptido a sequência da qual é derivada da sequência do referido epitopo críptico restringido a HLA-B*0702 pela substituição mencionada, qualquer que seja o método técnico utilizado para obter o referido péptido. Por exemplo, o péptido pode ser produzido através da síntese de um péptido artificial ou por expressão recombinante.

O método de acordo com a invenção pode ser realizado para identificar epitopos que podem despoletar uma resposta imunogénica contra vários membros de qualquer família multigénica conhecida, tal como as famílias MAGE-A, HER, BAGE ou GAGE. Numa forma de realização preferida, ilustrada na parte experimental abaixo, a referida família multigénica é a família MAGE-A.

Outro aspeto da presente invenção é um péptido isolado identificado por um método como descrito acima, em que o referido péptido selecionado é selecionado no grupo que consiste em MPKTGFLII (SEQ ID No: 2), MPKTGLLII (SEQ ID No: 3), FPKTGLLII (SEQ ID No: 4), VPKTGLLII (SEQ ID No: 5), MPKAGLLII (SEQ ID No: 6), MPKTGILIL (SEQ ID No: 7), MPKTGFLIIV (SEQ ID No: 8), MPKTGFLIII (SEQ ID No: 9),

MPKTGLLIIV (SEQ ID No: 10), FPKTGLLIIV (SEQ ID No: 11),
VPKTGLLIIV (SEQ ID No: 12), MPKAGLLIIV (SEQ ID No: 13),
MPKTGILILI (SEQ ID No: 14), GPRALAETS (SEQ ID No: 15),
GPRALIETS (SEQ ID No: 16), GPRALVETS (SEQ ID No: 17),
GPRALAETSY (SEQ ID No: 18), GPRALIETSY (SEQ ID No: 19),
GPRALVETSY (SEQ ID No: 20), EPRKLLTQD (SEQ ID No: 21),
HPRKLLTQD (SEQ ID No: 22), DPKKLLTQH (SEQ ID No: 23),
DPKKLLTQY (SEQ ID No: 24), HPKLLMQD (SEQ ID No: 25),
EPRKLLTQDL (SEQ ID No: 26), EPRKLLTQDW (SEQ ID No: 27),
HPRKLLTQDL (SEQ ID No: 28), HPKLLMQDL (SEQ ID No: 29),
DPKKLLTQHF (SEQ ID No: 30), DPKKLLTQYF (SEQ ID No: 31).

Certamente, no presente texto, o termo "péptido isolado" não deve ser considerado de forma restrita. Pelo contrário, este termo designa não apenas moléculas nas quais os resíduos de aminoácidos (nas configurações L ou D) estão unidos pelas ligações peptídicas (-CONH-), mas também pseudopéptidos sintéticos ou peptidomiméticos nos quais a ligação peptídica é modificada, especialmente para se tornar mais resistente à proteólise, e desde que a sua imunogenicidade não seja prejudicada por esta modificação.

Os péptidos imunogénicos otimizados derivados dos epitopos da lista acima são também parte da presente invenção. No que se segue, a expressão "péptido otimizado" ou "epitopo imunogénico otimizado restringido a HLA-B*0702" irá designar um péptido imunogénico derivado de um epitopo restringido a HLA-B*0702 (designado o seu "péptido nativo cognato") através de um método como descrito acima e em WO 2008/010098. Os péptidos otimizados de acordo com a

invenção são péptidos das SEQ ID Nos: 32 até 67, revelados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Péptidos restringidos a HLA-B7 nativos e correspondentes otimizados altamente homólogos contra antígenos MAGEA (as seqüências antigénicas estão destacadas)

Péptidos nativos			Seqüência antigénica correspondente a IMAGE-A	Péptido otimizado	
Nome	seqüência	Seq ID n°		seqüência	Seq ID n°
MAGE-A 188 (9 meros)	MPKTGFLII	2	MAGE A1, A6	APKTGFLII	32
				MPKTGFLIL	33
	MPKTGLLII	3	MAGE A2,	APKTGLLII	34
	FPKTGLLII	4	MAGE A4,	MPKTGLLIL	35
	VPKTGLLII	5	MAGE A12	FPKTGLLIL	36
				VPKTGLLIL	37
	MPKAGLLII	6	MAGE A3	APKAGLLII	38
		MPKAGLLIL	MPKAGLLIL	39	
	MPKTGILIL	7	MAGE A10	APKTGILIL	40
MAGE-A 188 (10 meros)	MPKTGFLIIV	8	MAGE A1,	APKTGFLIIV	41
	MPKTGFLIII	9	MAGE A6	APKTGFLIII	42
				MPKTGFLIIL	43
	MPKTGLLIIV	10	MAGE A2,	APKTGLLIIV	44
	FPKTGLLIIV	11	MAGE A4,	MPKTGLLIIL	45
	VPKTGLLIIV	12	MAGE A12	FPKTGLLIIL	46
				VPKTGLLIIL	47
	MPKAGLLIIV	13	MAGE A3	APKAGLLIIV	48
				MPKAGLLIIL	49
	MPKTGILILI	14	MAGE A10	APKTGILILI	50
			MPKTGILLIL	51	
MAGE-A 267 (9 meros)	GPRALAEETS	15	MAGE A1, A4	GPRALAEETL	52
	GPRALIETS	16	MAGE A2, A6	GPRALIETL	53
	GPRALVETS	17	MAGE A3, A12	GPRALVETL	54

(continuação)

Péptidos nativos			Sequência antigénica	Péptido otimizado	
Nome	sequência	Seq ID n°	correspondente a IMAGE-A	sequência	Seq ID n°
MAGE-A 267 (10 meros)	GPRALAE T SY	18	MAGE A1, A4	GPRALAE T SL	55
	GPRALIE T SY	19	MAGE A2, A6	GPRALIE T SL	56
	GPRALVE T SY	20	MAGE A3, A12	GPRALVE T SL	57
MAGE-A 233 (9 meros)	EPRKLLTQD	21	MAGE A1, A4, A10	EPRKLLTQL	58
	HPRKLLTQD	22	MAGE A12	HPRKLLTQL	59
	DPKLLTQH	23	MAGE A3	DPKLLTQL	60
	DPKLLTQY	24	MAGE A6	DPKLLTQL	61
	HPKLLMQD	25	MAGE A2	HPKLLMQL	62
MAGE-A 233 (10 meros)	EPRKLLTQDL	26	MAGE A1	EPRKLLTQDL	63
	EPRKLLTQDW	27	MAGE A4, A10	APRKLLTQDL	64
	HPRKLLTQDL	28	MAGE A12		
	HPKLLMQDL	29	MAGE A2	APKLLMQDL	65
	DPKLLTQHF	30	MAGE A3	DPKLLTQHL	66
	DPKLLTQYF	31	MAGE A6	DPKLLTQYL	67

A vacinação para tumor poliespecífica oferece um controlo mais vasto das células tumorais do que a vacinação monoespecífica, reduzindo desse modo o risco de emergência de variantes de escape imunes. Na maioria dos casos, a imunoterapia é então mais eficiente quando se estabelecem como alvos vários epitopos do que quando estabelece como alvo apenas um epitopo, desde que o tumor seja conhecido por expressar todos os antígenos alvo. Os inventores descreveram anteriormente um polipéptido composto por péptidos crípticos otimizados restringidos a HLA-A*0201 derivados de três diferentes antígenos tumorais universais (TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} e MAGE-A_{248V9}), designado Vx-006 (WO 2007/073768). Vx-006 é capaz de induzir uma resposta celular CD8 poliespecífica tanto *in vivo* em murganhos HHD

transgênicos HLA-A*0201 como *in vitro* em humanos, enquanto a mistura de péptidos TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} e MAGE-A_{248V9} não conseguiu induzir uma resposta tri-específica. Assim, um polipéptido quimérico compreendendo vários epitopos pode ser mais eficiente do que uma mera mistura do mesmo epitopos para desencadear uma resposta contra mais do que um epitopo. Dependendo do contexto, um polipéptido quimérico compreendendo uma repetição de apenas um epitopo pode também desencadear uma resposta mais forte contra o referido epitopo do que um péptido consistindo no referido epitopo. Na verdade, uma organização de polipéptido (com vários epitopos diferentes ou com uma repetição de um único epitopo) pode produzir novos epitopos de junção, especialmente epitopos restringidos a CD4, capazes de otimizar a resposta imunitária específica para os péptidos alvo. Para além disso, quando os péptidos livres são injetados subcutaneamente, os péptidos ligam-se diretamente a moléculas de MHC de todas as células presentes no sítio da injeção. Como os polipéptidos necessitam de ser processados, a vacinação com polipéptidos é mais eficiente para direcionar péptidos antigênicos a Células que Apresentam Antigénico profissionais (APC) como Células Dendríticas.

Um outro aspeto da invenção é assim um polipéptido quimérico, compreendendo um, dois, três ou mais epitopos restringidos a HLAB*0702 como descritos acima. Em particular, um polipéptido quimérico de acordo com a invenção pode compreender um, dois, três ou mais epitopos restringidos a HLA-B*0702 nativo descritos acima, ou um, dois, três ou mais epitopos restringidos a HLA-B*0702

imunogénicos otimizados selecionados de entre as SEQ ID Nos: 32-67. Certamente, os epitopos restringidos a HLA-B*0702 otimizados podem também ser combinados, num polipéptido quimérico, a epitopos restringidos a HLA-B*0702 nativo que podem ser identificados como epitopos imunogénicos. Num polipéptido quimérico de acordo com a invenção, os epitopos podem ser diferentes um do outro, e/ou o mesmo epitopo pode ser repetido várias vezes.

Deve ser salientado que quando são utilizados conjuntamente vários epitopos específicos para a mesma molécula de HLA, quer seja numa mistura ou num polipéptido quimérico, os epitopos estão em competição para a ligação à molécula de HLA correspondente. Contrariamente, utilizando uma mistura de diferentes epitopos restringidos a HLA (HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702 ou outros), ou um polipéptido quimérico compreendendo os mesmos epitopos restringidos a HLA diferentes, não haverá competição para ligação a HLA, e uma resposta poliespecífica será obtida com certeza, desde que todas as moléculas de HLA sejam expressas no indivíduo vacinado.

Num polipéptido quimérico de acordo com a invenção, os epitopos restringidos a HLA-B*0702 crípticos ou imunogénicos (nativos ou otimizados), descritos acima, podem assim estar vantajosamente associados a péptidos HLA-A*0201 (WO 02/02716) e/ou HLA-B*0702 (WO 2008/010010 e WO 2008/010098) previamente descritos, e/ou a péptidos HLA-A*2402 como descrito na Tabela 2 abaixo, e/ou a epitopos imunogénicos derivados de antigénios associados a tumor

previamente descritos, compreendendo CEA, PRAME, Tirosinase, TRAG-3, NY-Eso-1, P53, Muc-1, PSA/PSMA, survivina, Melan-A/MART- 1, TRP-1, TRP-2, WT1, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, G250/MN/CAIX, STEAP, alfafetoproteína, RAGE-1, PAGE- 1. Certamente, uma mistura de péptidos polialélicos, compreendendo pelo menos um péptido de acordo com a presente invenção e um epítipo restringido a HLA diferente (HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702 ou outros), é também parte da presente invenção.

Exemplos de epítipos que podem ser combinados vantajosamente com epítipos MAGE-A restringidos a HLA-B*0702 (quer numa mistura ou num polipéptido quimérico), assim como exemplos de epítipos imunogénicos otimizados que podem ser combinados vantajosamente com epítipos MAGE-A imunogénicos restringidos a HLA-B*0702 (nativa ou otimizada), como descrito na Tabela 2 abaixo. Certamente, estas listas não são limitativas.

Tabela 2: Epítipos HLA-A2, -B7 e -A24 que podem ser combinados com epítipos MAGE-A restringidos a HLA-B*0702 em polipéptidos quiméricos de acordo com a invenção

HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido otimizado		
Antigénio	sequência	No	Nome	sequência	No
Mart-1 ₂₇	AAGIGILTV	68	Mart- _{127Y1}	YAGIGILTV	112
Mart-1 ₂₆	EAAGIGILTV	69	Mart- _{126LT7}	ELAGIGILTV	113
Gp100 ₁₇₇	AMLGHTMEV	70	Gp100 _{177Y1}	YMLGHTMEV	114
Gp100 ₁₇₈	MLGHTMEV	71	Gp100 _{178Y1}	YLGHTMEV	115

(continuação)

HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido otimizado		
Gp100 ₁₅₄	KTWGQYWQV	72	Gp100 _{154Y1}	YTWGQYWQV	116
			Gp100 _{154M155}	KMWGQYWQV	117
Gp100 ₅₇₀	SLADTNSLAV	73	Gp100 _{570Y1}	YLADTNSLAV	118
Gp100 ₂₀₉	TDQVPFSV	74	Gp100 _{209Y1}	YDQVPFSV	119
			Gp100 _{209M210}	YMQVPFSV	120
Gp100 ₄₇₆	VLYRYGSFSV	75	Gp100 _{476Y1}	YLYRYGSFSV	121
Gp100 ₄₅₇	LLDGTATLRL	76	Gp100 _{457Y1}	YLDGTATLRL	122
HER-2/neu ₇₉₉	QLMPYGCLL	77	HER-2/neu _{799Y1}	YLMPYGCLL	123
HER-2/neu ₃₆₉	KIFGSLAFL	78	HER-2/neu _{369Y1}	YIFGSLAFL	124
HER-2/neu ₇₈₉	CLTSTVQLV	79	HER-2/neu _{789Y1}	YLTSTVQLV	125
HER-2/neu ₄₈	HLYQGCQW	80	HER-2/neu _{48Y1}	YLYQGCOW	126
HER-2/neu ₇₇₃	VMAGVGSPYV	81	HER-2/neu _{773Y1}	YMAGVGSPYV	127
HER-2/neu ₅	ALCRWGLL	82	HER-2/neu _{5Y1}	YLCRWGLL	128
HER-2/neu ₈₅₁	VLVKSPNHV	83	HER-2/neu _{851Y1}	VLVKSPNHV	129
HER-2/neu ₆₆₁	ILLVVVLGV	84	HER-2/neu _{661Y1}	YLLVVVLGV	130
HER-2/neu ₆₅₀	PLTSIISAV	85	HER-2/neu _{650Y1}	YLTSIISAV	131
HER-2/neu ₄₆₆	ALIHNTHL	86	HER-2/neu _{466Y1}	YLIHNTHL	132
HER-2/neu ₄₀₂	TLEEITGYL	87	HER-2/neu _{402Y1}	YLEEITGYL	133
HER-2/neu ₃₉₁	PLQPEQLQV	88	HER-2/neu _{391Y1}	YLQPEQLQV	134
HER-2/neu ₉₇₁	ELVSEFSRM	89	HER-2/neu _{971Y1}	YLVSEFSRM	135
EphA2 ₆₁	DMPIYMYSV	90	EphA2 _{61Y1}	YMPIYMYSV	136
HER2 ₉₁₁	TVWELMTFGA	91 92	HER _{911Y1V10}	YVWELMTFGV	137
HER4 ₉₁₁	TIWELMTFGG				
HER1 ₉₁₁	TVWELMTFGS				
HER2 ₇₂₂	KVKVLGSGA	94	HER _{722Y1V9}	YVKVLGSGV	138
HER3 ₇₂₂	KLKVLGSGV	95			
HER4 ₇₂₂	RVKVLGSGA	96			
HER1 ₇₂₂	KIKVLGSGA	97			
HER2 ₈₄₅	DLAARNVLV	98	HER _{845Y1}	YLAARNVLV	139
HER3 ₈₄₅	NLAARNVLL	99			
HER2 ₉₀₄	DVWSYGVTV	100	HER _{904Y1}	YVWSYGVTV	140
HER4 ₉₀₄	DVWSYGVTI	101			

(continuação)

HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido otimizado		
HER2 ₉₃₃	DLLEKGERL	102	HER _{933Y1}	YLLEKGERL	141
HER1 ₉₃₃	SILELKGERL	103			
HER2 ₉₄₅	PICTIDVYMI	104	HER _{945Y1}	YICTIDVYMV	142
HER39 ₄₅	QICTIDVYMV	105			
BER4 ₉₄₅	PICTIDVYMV	106			
HER1 ₉₄₅	PICTIDVYKI	107			
MAGE-A _{248G9}	YLEYRQVPG	108	MAGE-A _{248V9}	YLEYRQVPV	143
MAGE-A _{248D9}	YLEYRQVPD	109			
TERT ₉₈₈	DLQVNSLQTV	110	TERT _{988Y1}	YLQVNSLQTV	144
TERT ₅₇₂	RLFFYRKSV	111	TERT _{572Y1}	YLFFYRKSV	145
HLA-B*0702					
Péptido nativo			Péptido otimizado		
Nome	sequência	No	Nome	sequência	No
TERT ₄₄₄	DPRRLVQLL	146	TERT _{444A1}	APRRLVQLL	151
CEA _{188/554}	SPRLQLSNG	147	CEA _{188/554L9}	SPRLQLSNL	152
HER-2/neu ₁₀₆₉	APRSPLAPS	148	HER-2/neu _{1069L9}	APRSPLAPL	153
HER-2/neu ₇₆₀	SPKANKEIL	149	HER-2/neu _{760A1}	APKANKEIL	154
HER-2/neu ₂₄₆	GPKHSDCLA	150	HER-2/neu _{246A1}	APKHSDCLA	155
HLA-A*2402					
Péptido nativo			Péptido otimizado		
Nome	sequência	No	Nome	sequência	No
TERT 403	PYGVLKTH	156	TERT 403 _{KIL9}	KYGVLKTL	165
TERT 770	PYMRQFVAH	157	TERT 770 _{RIL9}	RYMRQFVAL	166
HER 780	PYVSRLGI	158	HER 780 _{R1}	RYVSRLGI	167
EphA2 47	PYGKGDLM	159	EphA2 47 _{RIL9}	RYGKGDLL	168
EphA2 502	TYLVQVQAL	160	EphA2 502 _{R1}	RYLVQVQAL	169
EphA2 817	PYWELSNHE	161	EphA2 817 _{RIL9}	RYWELSNHL	170
Her2/neu 922	PYDGIPARE	162			
MAGE 261	RYEFLWGPR	163			
Her2/neu 300	PYNYLSTDV	164			

O especialista na técnica pode selecionar

qualquer técnica conhecida para produzir esses polipéptidos. Por exemplo, o polipéptido pode ser obtido por síntese química, ou utilizando a tecnologia de engenharia genética (Velders *et al.*, 2001).

Outro objetivo da presente invenção é uma molécula de ácido nucleico isolado concebido para provocar a expressão de um epitopo MAGE-A restringido a HLA-B*0702 críptico, ou de um epitopo MAGE-A restringido a HLA-B*0702 imunogénico (seja nativo ou otimizado), ou de um polipéptido quimérico como acima descrito. Por "concebido para provocar a expressão de" um péptido entende-se aqui que o referido péptido é expresso como tal, isolado do antigénio total a partir do qual a sua sequência foi selecionada (e, em casos apropriados, otimizada como acima descrito), quando o ácido nucleico é introduzido numa célula apropriada. A região que codifica o epitopo ou polipéptido quimérico estará tipicamente situada no polinucleótido sob controlo de um promotor adequado. Os promotores bacterianos será preferido para expressão em bactérias, que podem produzir o polipéptido ou *in vitro*, ou, em particular circunstâncias, *in vivo*. Um exemplo de bactérias que pode ser utilizado para produzir um péptido ou polipéptido de acordo com a invenção, diretamente *in vivo*, é *Listeria monocytogenes*, que é uma bactéria intracelular facultativa que entra nas células que apresentam um antigénio profissional por fagocitose ativa (Paterson e Maciag, 2005). Alternativamente, um ácido nucleico de acordo com a invenção pode ser administrado

diretamente, utilizando um vetor apropriado. Neste caso, pode ser utilizado um promotor específico para o tecido, constitutivo forte, ou endógeno para controlar a expressão do péptido. Sistemas de vetor adequados incluem plasmídeos de DNA nu (não encapsulado), composições lipossômicas para aumentar a distribuição, e vetores virais que provocam expressão transiente. Exemplos de vetores virais são vetores de adenovírus ou de vírus vaccinia e vetores da família do herpes, especialmente numa forma não-replicativa.

A presente invenção também pertence a uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos, como um princípio ativo, um epitopo críptico restringido a HLA-B*0702 como acima descrito, ou um epitopo MAGE-A imunogénico (otimizado ou nativo) restringido a HLAB* 0702 como mencionado acima, ou um polipéptido quimérico de acordo com a invenção, ou um ácido nucleico que codifica qualquer um destes, e/ou um vetor contendo o referido ácido nucleico. A formulação de composições farmacêuticas estará de acordo com os padrões e técnicas atuais. Os medicamentos destinados a administração humana serão preparados em condições adequadamente estéreis, em que o ingrediente(s) ativo(s) é/são combinado(s) com uma solução isotónica ou outro veículo farmacêutico apropriado para a utilização terapêutica recomendada. Formulações e técnicas adequadas são as geralmente descritas na última edição de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton PA).

Em particular, pode ser utilizado um epitopo

MAGE-A restringido a HLA-B*0702 ou um polipéptido quimérico ou um ácido nucleico de acordo com a invenção para a preparação de uma composição para imunoterapia anti-cancro preventiva ou curativa. O péptido GPRALVETL (SEQ ID No: 54), e os polipéptidos quiméricos que o compreendem, são especialmente adequados para este objetivo.

Numa forma de realização particular, uma composição farmacêutica de acordo com a invenção é uma vacina. Neste ultimo caso, os componentes acima descritos podem ser combinados com um adjuvante para potenciar a resposta imunitária. Adjuvantes clássicos incluem emulsões em óleo, como adjuvante Incompleto de Freund ou Montanide, e superfícies aderentes tais como alúmen. Adjuvantes que recrutam e ativam células dendríticas particularmente através de TLR (tais como DNA bacteriano ou proteínas derivadas da membrana bacteriana) ou auxiliam a induzir células T citotóxicas são especialmente úteis. Outros fatores que de outro modo reforçam a resposta imunitária ou promovem a apoptose ou eliminação de células de cancro podem também ser incluídas na composição, tal como IL-2 ou IL-12 citocinas ou GM-CSF.

Podem ser embaladas doses múltiplas e/ou diferentes combinações das composições imunogénicas desta invenção para distribuição separadamente ou em conjunto. Cada composição ou conjunto de composições, tais como os kits de partes aqui descritas, podem ser acompanhadas com instruções escritas sobre a utilização da composição ou

combinação para induzir uma resposta imunitária e/ou para o tratamento do cancro.

Num pedido de patente anterior (WO 2006/120038), o Requerente descreveu um protocolo de vacinação que permite a iniciação e manutenção de uma resposta de células T dirigidas a epitopos crípticos/subdominantes. Os resultados reportados em WO 2006/120038 demonstram que a injeção de um péptido nativo que corresponde a um epitopo críptico/subdominante, após vacinação com o seu péptido otimizado cognato, pode manter a resposta imunitária iniciada pelo referido péptido otimizado.

De acordo com a invenção, um epitopo críptico MAGE-A restringido a HLA-B*0702 pode assim ser utilizado para a preparação de uma composição medicinal para manter a resposta imunitária de CTL iniciada pelo seu péptido otimizado cognato. Um péptido imunogénico possuindo uma sequência de epitopo MAGE-A restringido a HLA-B*0702 otimizado imunogénico derivado de um epitopo críptico MAGE-A restringido a HLA-B*0702 também pode ser utilizado, para a preparação de uma composição medicinal para iniciar uma resposta imunitária de CTL contra o referido epitopo críptico MAGE-A restringido a HLA-B*0702, nas também contra todos os epitopos do grupo selecionados no passo (iii) do método acima descrito. Obviamente, a mistura de péptidos do grupo selecionado no passo (iii) também pode ser utilizada para manter a resposta imunitária de CTL iniciada pelo péptido essencialmente partilhado. Por exemplo, pode ser

utilizada uma mistura de péptidos SEQ ID No: 15-17 para manter a resposta imunitária de CTL iniciada pelo péptido da SEQ ID No: 54.

A presente invenção também engloba um método para vacinar um doente contra um antigénio tumoral ou viral, em que o referido método compreende um primeiro passo de vacinação com um péptido imunogénico otimizado cognato para um epitopo críptico MAGE-A nativo restringido a HLA-B*0702 do referido antigénio ou epitopos do grupo selecionado no passo (iii), seguido por um segundo passo de vacinação com o referido péptido nativo ou mistura de péptidos do grupo considerado.

Nesse método, o primeiro passo e/ou o segundo passo pode ser realizado utilizando um polipéptido quimérico compreendendo um, dois, três ou mais péptidos crípticos otimizados ou como acima descrito, em vez de péptidos de epitopo único. Em particular, pode ser utilizado um polipéptido quimérico compreendendo vários epitopos crípticos possuindo pelo menos uma posição variante na sua região antigénica, para manter a resposta imunitária de CTL iniciada por um péptido otimizado cognato para um dos referidos epitopos crípticos. Por exemplo, pode ser utilizado um polipéptido quimérico compreendendo as sequências SEQ ID No: 15-17 para manter a resposta imunitária de CTL iniciada pelo péptido da SEQ ID No:54. Deve ser salientado que devido à expressão de tropismo de antigénios MAGE-A, se um epitopo restringido a HLA-B*0702

como descrito acima demonstra ser imunogénico, o mesmo epitopo nativo imunogénico pode ser utilizado em ambos os passos de vacinação. Em particular, um epitopo MAGE-A nativo imunogénico pode ser combinado vantajosamente com epitopos crípticos nativos num primeiro polipéptido quimérico ou mistura de péptidos de mono-epitopo, e com epitopos otimizados, num segundo polipéptido quimérico ou mistura de péptidos de mono-epitopo.

A invenção também pertence a um kit de partes compreendendo, em formulações separadas ou recipientes (frascos, tubos, etc.):

- (i) um primeiro péptido compreendendo uma sequência de um epitopo MAGE-A nativo restringido a HLA-B*0702 (preferencialmente críptico), e
- (ii) um segundo péptido compreendendo uma sequência correspondente a um epitopo otimizado imunogénico cognato para o epitopo nativo referido em (i).

Exemplos de péptidos que podem ser parte de um kit de acordo com a invenção são os péptidos das SEQ ID Nos: 2 até 31 que podem constituir o primeiro péptido, sendo o segundo péptido então derivado do referido primeiro péptido por um método para aumentar a sua imunogenicidade, como descrito acima e em WO 2008/010098. Um kit preferido de acordo com a invenção compreende o péptido da SEQ ID No: 54 e, noutro recipiente, o péptido da SEQ ID No: 17 ou 15 ou

16, preferencialmente o péptido da SEQ ID No: 17. Numa variante deste kit, o kit também compreende péptidos das SEQ ID Nos: 16 e/ou 15, quer seja no mesmo recipiente como a SEQ ID No: 17, ou num ou vários recipiente(s) separado(s).

Outros kits de partes de acordo com a invenção compreendem pelo menos um polipéptido quimérico. Nesta forma de realização, o kit também compreende pelo menos um péptido cognato para um dos epitopos compreendidos neste polipéptido quimérico, em que o referido péptido cognato é isolado ou incluído noutra polipéptido quimérico.

Estão contempladas várias variantes preferidas desses kits: numa primeira forma de realização, o kit compreende, em formulações separadas, um primeiro polipéptido quimérico compreendendo um, dois, três ou mais epitopos crípticos MAGE-A restringido a HLA-B*0702, e um segundo polipéptido quimérico correspondendo ao seu polipéptido quimérico MAGE-A cognato restringido a HLA-B*0702 imunogénico (que significa que compreende epitopos imunogénicos MAGE-A otimizados cognatos restringidos a HLA-B*0702 para os epitopos crípticos compreendidos no primeiro polipéptido quimérico). Numa segunda forma de realização, o kit compreende um, dois, três ou mais péptidos correspondendo a epitopos crípticos distintos restringidos a HLA-B*0702 MAGE-A, em que os referidos péptidos são misturados numa única formulação, ou separados em várias formulações e, numa formulação separada, um polipéptido quimérico compreendendo os epitopos imunogénicos cognatos otimizados

restringidos a HLA-B*0702 MAGE-A para os referidos péptidos crípticos.

Como mencionado acima, uma estimulação polialélica (*i.e.*, utilizando epitopos específicos para diferentes moléculas de HLA) pode ser realizada vantajosamente para obter uma resposta poliespecífica. Consequentemente, formas de realização preferidas dos kits de acordo com a invenção compreendem, em recipientes separados:

(i) uma mistura de péptidos polialélicos ou um péptido polialélico quimérico, compreendendo pelo menos um epitopo nativo MAGEA restringido a HLA-B*0702 (preferencialmente críptico) como descrito acima e pelo menos um epitopo diferente restringido a HLA nativo (preferencialmente críptico) (de um antigénio da família MAGE-A ou de outro antigénio), e

(ii) uma mistura de péptidos polialélicos ou um péptido polialélico quimérico, compreendendo pelo menos um epitopo imunogénico cognato MAGE-A restringido a HLA-B*0702 para o epitopo nativo MAGE-A restringido a HLA-B*0702 referido em (i), e pelo menos outro epitopo imunogénico cognato para o outro epitopo nativo referido em (i).

Alternativamente, os kits de acordo com a invenção podem compreender, em vez de pelo menos parte os péptidos ou polipéptidos quiméricos, ácido(s) nucleico(s)

que codificam os referidos péptidos ou polipéptidos quiméricos. Neste caso, o(s) ácido(s) nucleico(s) é(são) como acima descrito.

Na descrição seguinte dos mesmos kits específicos de acordo com a invenção, será feita menção apenas aos péptidos (nativos ou otimizados) aí incluídos; entende-se que os polipéptidos quimérico(s) (compreendendo epitopos nativos crípticos ou epitopos otimizados) podem ser incluídos nos kits em vez de péptidos de epitopo único, e que o(s) ácido(s) nucleico(s) podem também ser incluídos adicionalmente ou em vez de pelo menos parte dos referidos péptidos ou polipéptidos quiméricos.

Numa forma de realização particular da invenção, o kit é um kit de vacinação, em que os referidos primeiro (nativo) e segundo (cognato otimizado) péptidos estão em doses de vacinação separadas. Numa forma de realização preferida, o kit de vacinação compreende 2 ou 3 doses do péptido otimizado, e 3, 4, 5 ou 6 doses de péptido nativo. Um kit de vacinação particular de acordo com a invenção é adaptado para a primeira sequência de vacinação de 6 injeções, e compreende 2 ou 3 doses de péptido otimizado, e 4 ou 3 doses de péptido nativo. No caso de doenças de longa duração, é preferível manter o nível de imunidade obtida após esta primo-vacinação, através de reforços regulares. Isto pode ser realizado, por exemplo, através de injeções realizadas a cada 1 a 6 meses. Por isso, kits complementares, compreendendo pelo menos 2 doses, e até 40 ou 50

doses de péptido nativo, são também parte da presente invenção. Alternativamente, o kit de vacinação pode compreender 2 a 3 doses de péptido otimizado, e 3 até 40 ou até 50 doses de péptido nativo. Certamente, os referidos péptidos nativo e otimizado presentes no kit são como descritos acima.

Cada dose compreende entre 0,1 e 10 mg de péptido, preferencialmente desde 1 até 5 mg, ou entre 1 e 20 mg de polipéptido. Numa forma de realização preferida, cada dose é formulada por injeção subcutânea. Por exemplo, cada dose pode ser formulada em 0,3 até 1,5 ml de uma emulsão de solução aquosa emulsificada com Montanide ISA51, utilizada como um adjuvante. O especialista na técnica pode selecionar qualquer outro(s) adjuvante(s) em lugar de (ou adicionalmente a) Montanide ISA51. Numa forma de realização particular, as doses estão na forma de uma solução aquosa. Alternativamente, as doses podem estar na forma de um péptido liofilizado, para preparação extemporânea da solução líquida a ser injetada. Outros componentes possíveis dos referidos kits são um ou vários adjuvantes, a serem adicionados às composições peptídicas antes da administração, e uma notícia descrevendo como utilizar os referidos kits.

A invenção é ainda ilustrada pelas seguintes figuras e exemplos.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Sequências da família de multigenes MAGE-A. De modo a identificar um ou mais epitopos partilhados pelos vários antigénios MAGE-A e apresentados pela molécula de HLA-B*0702, as sequências dos antigénios MAGE-A foram alinhadas, e as regiões de pelo menos 5 aminoácidos foram selecionadas na base da sua homologia entre esses antigénios (dentro de caixas com linha preta contínua). Os aminoácidos que são completamente idênticos a MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12 e/ou -A10 são destacados a cinzento.

Figura 2: Imunogenicidade de péptidos crípticos otimizados restringidos a HLA-B*0702. Murganhos transgênicos para HLA-B*0702 foram vacinados com os péptidos otimizados seguindo o protocolo descrito e os CTL gerados foram testados contra alvos T2-B7 carregados com os péptidos otimizado e com os correspondentes nativos como indicado. A; Vacinação com o péptido MAGE-A A1L9 da SEQ ID No: 171, B; Vacinação com o péptido monomodificado MAGE A L9 da SEQ ID No: 54.

EXEMPLOS

Os exemplos foram realizados utilizando os seguintes materiais e métodos:

Murganhos Transgênicos. Os murganhos *knockout* de classe I para HLA-B7 H-2 foram descritos anteriormente (Rohrlich *et al.*, 2003).

Células. As células T2-B7 transfetadas com HLA-B*0702 foram previamente descritas (Rohrlich *et al.*, 2003).

Péptidos e Plasmídeos. Os péptidos foram sintetizados por Epytop (Nîmes, França). O plasmídeo HLA-B*0702 foi fornecido por Dr. Lemonnier (Institut Pasteur, Paris, França) (Rohrlich *et al.*, 2003).

Medição da Afinidade Relativa do péptido para HLA-B*0702. O protocolo utilizado foi descrito anteriormente (Rohrlich *et al.*, 2003). Resumidamente, as células T2-B7 foram incubadas a 37 °C durante 16 horas com concentrações de péptidos que variam desde 100 µM até 0,1 µM, e depois coradas com o anticorpo monoclonal (mAb) ME-1 para quantificar a expressão de superfície de HLA-B*0702. Para cada concentração de péptido, a coloração específica para HLA-B*0702 foi calculada como a percentagem de coloração obtida com 100 µM do péptido de referência CMV₂₆₅₋₂₇₄ (R10V; RIPHERNGFTV, SEQ ID NO: 172). A afinidade relativa (RA) foi determinada como: RA = (Concentração de cada péptido que induz 20% da expressão de HLA-B*0702/Concentração do péptido de referência que induz 20% da expressão de HLA-B*0702).

Indução de CTL in vivo em Murganhos Transgênicos para HLA-B*0702. Os murganhos foram injetados subcutaneamente com 100 mg de péptido emulsificado em adjuvante Incompleto de Freund (IFA) na presença de 150 µg do epitopo de HBVcore₁₂₈ T helper restringido para I-Ab (TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO: 173). Após 11 dias, foram estimuladas 5×10^7 células de baço *in vitro* com o péptido (10 µM). No dia 6 da cultura, as populações que apresentaram resposta em grupo foram testadas para a citotoxicidade específica.

Ensaio Citotóxico. Os alvos foram marcados com 100 µCi de Cr⁵¹ durante 60 min, plaqueados em placas de 96 poços de fundo em V (3×10^3 células/poço em 100 µL de meio RPMI 1640) e, quando necessário, pulsados com péptidos (1 µM) a 37 °C durante 2 horas. Foram então adicionados efetores às paredes e incubados a 37 °C durante 4 horas. A percentagem de lise específica foi determinada como: % Lise = (Libertação Experimental - Libertação Espontânea)/(Libertação Máxima - Libertação Espontânea) x 100.

Exemplo 1: identificação de epitopos crípticos apresentados pela molécula HLA-B*0702 que são partilhados pelos antígenos MAGe-A1, -A2, -A3, -A4, A6, -A12 e/ou -A10, e determinação das suas afinidades com a referida molécula de HLA

De modo a identificar um ou mais epitopos

partilhados pelos vários antigénios MAGE-A e apresentados pela molécula de HLAB* 0702, as sequências dos antigénios MAGE-A foram alinhadas (figura 1), e regiões de 9 a 10 aminoácidos foram pesquisadas com base na sua homologia entre antigénios MAGE -A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12 e/ou -A10 (sequências destacadas a cinzento, figura 1). Na medida em que a sequência de MAGE -A10 é menos homóloga a MAGE-A1, as sequências partilhadas de -A2, -A3, -A4, -A6, -A12, não foram eliminadas se não foi encontrado equivalente em MAGE-A10 (figura 1).

Na seguinte descrição, estas regiões de 9 a 10 aminoácidos são descritas em referência à posição do seu primeiro aminoácido na sequência de MAGE-A1. Foram identificadas apenas duas regiões de pelo menos 9 aminoácidos (posição 181 e 270). Como descrito anteriormente, como existem poucas sequências homólogas, os autores descreveram um método para identificar uma sequência de 8 a 10 aminoácidos compreendendo pelo menos uma sequência de pentapéptido comum precedida por 3 aminoácidos na extremidade N-terminal e, opcionalmente, seguido por um ou dois aminoácidos na extremidade C-terminal; na verdade, os autores descobriram que uma identidade limitada à sequência de 5 aminoácidos que se estendem a partir das posições P4 a P8 do péptido era suficiente. As sequências de pelo menos 5 aminoácidos comuns são inseridas em caixas na figura 1. Utilizando este método de seleção, foram identificadas quatro regiões adicionais (posição 21, 65, 132, 256).

Os péptidos de 9 ou 10 aminoácidos possuindo um P na posição 2 e um aminoácido selecionado no grupo que consiste em R, K, H e M na posição 3 correspondendo a péptidos restringidos a HLA-B*0702 foram então identificados. Como se observa na figura 1, não foi encontrada uma sequência completamente idêntica.

De modo a alargar a escolha dos péptidos candidatos, foi realizada uma segunda pesquisa, de acordo com o método descrito, para selecionar regiões que apresentam uma identidade de sequência completa entre as posições P4 e P8. Mais uma vez, não foi identificada nenhuma sequência. Finalmente, foi realizada uma terceira pesquisa, para selecionar sequências possuindo apenas um desemparelhamento entre as posições P4 e P8. As sequências identificadas estão na tabela 1 acima, e estão em caixas com linhas a tracejado na figura 1.

O grupo de MAGE-A 269 (9meros) foi selecionado na medida em que apenas três sequências diferentes permitem reconhecer todos os genes de MAGE-A (aceite MAGE-A10). Este grupo compreende três péptidos: MAGE-A A, SEQ ID No15 (MAGE-A1, -A4), MAGE-A I, SEQ ID No16 (MAGE-A2, -A6) e MAGE-A V, SEQ ID No17 (MAGE-A3, -A12), que diferem em termos da sua posição P6. Não foi encontrada nenhuma sequência correspondente em MAGE-A10.

Cada péptido foi testado quanto à sua capacidade para se ligar a HLA-B*0702 (tabela 3).

Tabela 3. Afinidade dos péptidos crípticos selecionados para HLA-B*0702.

Péptido	Sequência	RA	SEQ ID No
MAGE-A A	GPRALAETS	-	15
MAGE-A I	GPRALIETS	-	16
MAGE-A V	GPRALVETS	-	17

RA = Afinidade Relativa = (Concentração de cada péptido que induz 20% da expressão de HLA-B*0702/Concentração do péptido de referência que induz 20% da expressão de HLA-B*0702), (-) significa $RA > 10$, (+/-) $1 < RA < 10$, (+) $5 < RA < 10$, (++) $RA < 1$

Nenhum dos três péptidos nativos demonstrou ligar-se a moléculas de HLA-B*0702, apesar do fato de esses péptidos conterem posições âncora P2R3 primárias, demonstrando que são péptidos crípticos. O objetivo deste estudo foi descobrir um péptido imunogénico que é capaz de induzir uma resposta imunitária específica capaz de reconhecer uma célula qualquer que seja o gene MAGE-A expressado. Mais precisamente, os CTL induzidos pela vacinação com o péptido validado, têm que ser capazes de reconhecer uma célula que expressa ou apresenta ambos os péptidos nativos e crípticos de MAGE-A A, MAGE-A I e MAGE-A V (reconhecimento cruzado do péptido nativo). Os péptidos

selecionados foram então modificados para aumentar a sua imunogenicidade.

Exemplo 2: aumento da imunogenicidade do péptido selecionado

Para aumentar a afinidade de HLA-B*0702 e conseqüentemente a imunogenicidade destes péptidos de baixa afinidade, é necessário identificar motivos de âncora secundários desfavoráveis e substituí-los com motivos favoráveis. Os péptidos nativos foram selecionados para possuírem as posições âncora primárias P2R3; o interesse foi então focado na posição âncora secundária 1 e 9.

O primeiro péptido otimizado testado foi baseado na sequência MAGE-A V, modificada em ambas as posições respectivamente substituindo a P1 por uma alanina (A) e a P9 por uma leucina (L), conhecidos por serem aminoácidos favoráveis para ligação a HLA-B*0702.

O péptido MAGE-A A1L9 possui a sequência APRALVETL (SEQ ID n°171), e foi capaz de se ligar a MHC (Tabela 4), confirmando que as modificações aumentaram a sua afinidade para moléculas de HLA-B*0702. Foram então vacinados com o péptido modificado murganhos transgênicos para HLA-B*0702, e onze dias mais tarde, células do seu baço foram estimuladas *in vitro* com o péptido. Como observado na figura 2A e na tabela 4, o péptido modificado

era imunogénico mas os CTLs induzidos específicos para MAGE-A A1L9 não foram capazes de reconhecer em reacção cruzada os péptidos nativos.

As substituições deveriam, todavia, preservar a conformação do segmento do péptido que interatua com a TCR, preservando a especificidade do péptido. Na medida em que duas modificações podem modificar dramaticamente a conformação do péptido, foi testado um novo péptido otimizado, apenas modificado na posição 9. Na verdade, uma G na posição 1 é descrita como neutra e não desfavorável para a afinidade do péptido para MHC.

MAGE-A L9 (SEQ ID No: 54) demonstrou ser fortemente imunogénica, na medida em que todos os murganhos vacinados desenvolveram uma resposta imunitária específica contra o MAGE-A L9. Mais importante, os CTLs induzidos pelo péptido MAGE-A L9 foram capazes de reconhecer uma célula alvo carregada com cada um dos péptidos crípticos nativos (figura 2B e tabela 4).

Tabela 4: afinidade e imunogenicidade dos péptidos otimizados.

Péptido	Sequência	RA	Imuno- genicidade	Reconhecimento cruzado do péptido nativo	SEQ ID No
MAGE-A A	GPRALAETS	-			15
MAGE-A I	GPRALIETS	-			16
MAGE-A V	GPRALVETS	-			17

(continuação)

Péptido	Sequência	RA	Imuno- genicidade	Reconhecimento cruzado do péptido nativo	SEQ ID No
AGE-A A1L9	APRALVETL	+	6/11	MAGE-A A (1/8) MAGE-A I (0/3) MAGE-A V (0/3)	171
MAGE-A L9	GPRALVETL	ND	18/18	MAGE-A A (3/8) MAGE-A I (3/5) MAGE-A V (4/5)	54

RA = Afinidade Relativa = (Concentração de cada péptido que induz 20% da expressão de HLA-B*0702/Concentração do péptido de referência que induz 20% da expressão de HLA-B*0702), (-) significa RA>10, (+/-) 1<RA<10, (+) 5<RA<10, (++) RA <1 (X/Y) significa que os murganhos X desenvolveram uma resposta específica para um total de Y murganhos vacinados.

REFERÊNCIAS

- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. e et al. (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40, 360-369.
- Graff-Dubois S, Faure O, Gross DA, Alves P, Scardino A, Chouaib S, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K. (2002) Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted shared epitope by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*. 169(1):575-80.
- Gross, D.A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Comet, S., Alves,

- P., Bennaceur-Griscelli, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., Lemonnier, F.A., Davoust, J., Miconnet, I., Vonderheide, R.H. and Kosmatopoulos, K. (2004) High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 113, 425-433.
- Menez-Jamet, J. e Kosmatopoulos, K. (2009) Development of optimized cryptic peptides for immunotherapy. *IDrugs*, 12, 98-102.
- Paterson, Y. and Maciag, P.C. (2005) Listeria-based vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther*, 7, 454-460.
- Rohrlich, P.S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N. and Lemonnier, F.A. (2003) HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol*, 15, 765-772.
- Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M. and Sette, A. (1993) Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74, 929-937.
- Tanzarella S, Russo V, Lionello I, Dalerba P, Rigatti D, Bordignon C, Traversari C. (1999) Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res*. 59(11):2668-74.
- Tourdot, S., Scardino, A., Saloustrou, E., Gross, D.A., Pascolo, S., Cordopatis, P., Lemonnier, F.A. and Kosmatopoulos, K. (2000) A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol*, 30, 3411-3421.

Velders, M.P., Weijzen, S., Eiben, G.L., Elmishad, A.G., Kloetzel, P.M., Higgins, T., Ciccarelli, R.B., Evans, M., Man, S., Smith, L. and Kast, W.M. (2001) Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*, 166, 5366-5373.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> VAXON BIOTECH KOSMATOPOULOS , Kostantinos (Kostas) MENEZ-JAMET, Jeanne

<120> IDENTIFICAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS DE HLA-B*0702 PARTILHADOS PARA IMUNOTERAPIA

<130> VMAahF1788/5

<160> 173

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 1

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 2

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

PE2440575

- 43 -

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 3

Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 4

phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 5

Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 6

Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 7

Met Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu
1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 8

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 9

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile Ile
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 10

Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 11

Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 12

PE2440575

- 45 -

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 12

Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 13

Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 14

Met Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 15

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 16

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ser
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 17

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser
1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 18

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 19

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 20

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr
1 5 10

PE2440575

- 47 -

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 21

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 22

His Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 23

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 24

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Tyr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 48 -

<220>

<223> péptido

<400> 25

His Pro Lys Lys Leu Leu Met Gln Asp
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 26

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Leu
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 27

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Trp
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 28

His Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 29

His Pro Lys Lys Leu Leu Met Gln Asp Leu
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 30

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 31

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Tyr Phe
1 5 10

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 32

Ala Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 33

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Leu
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 34

Ala Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 35

Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 36

Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 37

Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 51 -

<220>

<223> péptido

<400> 38

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 39

Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 40

Ala Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu
1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 41

Ala Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 42

Ala Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 43

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile Leu
 1 5 10

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 44

Ala Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
 1 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 45

Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Leu
 1 5 10

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 46

Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Leu
 1 5 10

<210> 47

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 47

Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Leu
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 48

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 49

Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 50

Ala Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu Ile
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 51

Met Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu
1 5 10

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 52

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Leu
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 53

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Leu
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 54

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu
1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 55

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 56

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 57

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 58

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 59

His Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 60
<211> 9

PE2440575

- 56 -

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 60

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 61

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 62

His Pro Lys Lys Leu Leu Met Gln Leu
1 5

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 63

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Leu
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

PE2440575

- 57 -

<223> péptido

<400> 64

Ala Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Leu
1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 65

Ala Pro Lys Lys Leu Leu Met Gln Asp Leu
1 5 10

<210>66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 66

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Leu
1 5 10

<210>67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 67

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Tyr Leu
1 5 10

<210>68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 68

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

PE2440575

- 58 -

<210>69
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 69

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210>70
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 70

Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5 10

<210>71
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 71

Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

<210>72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 72

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210>73
<211> 10
<212> PRT

PE2440575

- 59 -

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 73

Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val
1 5 10

<210>74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 74

Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210>75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 75

Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val
1 5 10

<210>76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 76

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
1 5 10

<210>77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 77

Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu
1 5

<210>78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 78

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210>79

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 79

Cys Leu Thr Ser Thr val Gln Leu val
1 5

<210>80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 80

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Trp
1 5

<210>81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 81

val Met Ala Gly val Gly Ser Pro Tyr val
1 5 10

PE2440575

- 61 -

<210>82
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 82

Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
1 5

<210>83
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 83

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val
1 5

<210>84
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 84

Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val
1 5

<210>85
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 85

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

<210>86
<211> 9
<212> PRT

PE2440575

- 62 -

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 86

Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu
1 5

<210>87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 87

Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
1 5

<210>88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 88

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val
1 5

<210>89

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 89

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

<210>90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 90

Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
1 5

<210>91

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 91

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala
1 5 10

<210>92

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 92

Thr Ile Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Gly
1 5 10

<210>93

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 93

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
1 5 10

<210>94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 94

Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

PE2440575

- 64 -

<210>95
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 95

Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val
1 5

<210>96
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 96

Arg Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

<210>97
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 97

Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

<210>98
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 98

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
1 5

<210>99
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 65 -

<220>

<223> péptido

<400> 99

Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu
1 5

<210>100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 100

Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
1 5

<210>101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 101

Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Ile
1 5

<210>102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 102

Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210>103

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 103

Ser Ile Leu Glu Leu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5 10

<210>104

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 104

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile
1 5 10

<210>105

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 105

Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val
1 5 10

<210>106

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 106

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val
1 5 10

<210>107

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 107

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Lys Ile
1 5 10

PE2440575

- 67 -

<210>108
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 108

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly
1 5

<210>109
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 109

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp
1 5

<210>110
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 110

Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val
1 5 10

<210>111
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 111

Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

<210>112
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 68 -

<220>

<223> péptido

<400> 112

Tyr Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210>113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 113

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210>114

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 114

Tyr Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5 10

<210>115

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 115

Tyr Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

<210>116

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 116

Tyr Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210>117
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 117

Lys Met Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210>118
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 118

Tyr Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val
1 5 10

<210>119
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 119

Tyr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210>120
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 120

Tyr Met Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210>121

PE2440575

- 70 -

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 121

Tyr Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val
1 5 10

<210>122
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 122

Tyr Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
1 5 10

<210>123
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 123

Tyr Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu
1 5

<210>124
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 124

Tyr Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210>125
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 71 -

<220>

<223> péptido

<400> 125

Tyr Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
1 5

<210>126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 126

Tyr Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Trp
1 5

<210>127

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 127

Tyr Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
1 5 10

<210>128

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 128

Tyr Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
1 5

<210>129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 129

Tyr Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val
1 5

<210>130
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 130

Tyr Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val
1 5

<210>131
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 131

Tyr Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

<210>132
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
<400> 132

Tyr Leu Ile His His Asn Thr His Leu
1 5

<210>133
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 133

Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
1 5

<210>134

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 134

Tyr Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val
1 5

<210>135
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 135

Tyr Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

<210>136
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 136

Tyr Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
1 5

<210>137
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 137

Tyr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Val
1 5 10

<210>138
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 74 -

<220>

<223> péptido

<400> 138

Tyr Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Val
1 5

<210>139

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 139

Tyr Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
1 5

<210>140

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 140

Tyr Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
1 5

<210>141

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 141

Tyr Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210>142

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 142

Tyr Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Val
1 5 10

<210>143
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 143

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
1 5

<210>144
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 144

Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val
1 5 10

<210>145
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
<400> 145

Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

<210>146
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 146

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

<210>147
<211> 9

PE2440575

- 76 -

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 147

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly
1 5

<210>148
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 148

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
1 5

<210>149
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 149

Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5

<210>150
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 150

Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5

<210>151
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

PE2440575

- 77 -

<400> 151

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

<210>152

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 152

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu
1 5

<210>153

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 153

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Leu
1 5

<210>154

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 154

Ala Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5

<210>155

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 155

Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5

<210>156
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 156

Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His
1 5

<210>157
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 157

Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His
1 5

<210>158
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
<400> 158

Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
1 5

<210>159
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 159

Pro Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met
1 5

<210>160
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

PE2440575

- 79 -

<220>

<223> péptido

<400> 160

Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu
1 5

<210>161

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 161

Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu
1 5

<210>162

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 162

Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
1 5

<210>163

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 163

Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg
1 5

<210>164

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 164

Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val
1 5

<210>165

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 165

Lys Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr Leu
1 5

<210>166

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 166

Arg Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala Leu
1 5

<210>167

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 167

Arg Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
1 5

<210>168

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 168

Arg Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Leu
1 5

<210>169
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 169

Arg Tyr Leu Val Glu Val Glu Ala Leu
1 5

<210>170
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 170

Arg Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Leu
1 5

<210>171
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
<400> 171

Ala Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu
1 5

<210>172
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 172

Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val
1 5 10

<210>173
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar um péptido restringido a HLA-B*0702 que pode desencadear uma resposta citotóxica contra pelo menos dois antigénios da família multigénica MAGE-A, compreendendo pelo menos os seguintes passos:

(i) identificar, nos genes da referida família multigénica, péptidos de 9 ou 10 aminoácidos possuindo um P na posição 2 e um aminoácido selecionado no grupo consistindo em R, K, H e M na posição 3;

(ii) alinhar as sequências obtidas em (i);

(iii) identificar, entre os péptidos obtidos no passo (i), um grupo de pelo menos dois péptidos, em que pelo menos um péptido é um "péptido essencialmente partilhado", *i.e.*, é tal que a sua região antigénica difere daquela dos outros péptidos do grupo em no máximo um resíduo, em que da referida região antigénica se estende desde a posição 4 até à posição 8 num péptido possuindo 9 aminoácidos, e desde a posição 4 até à posição 9 num péptido possuindo 10 aminoácidos;

(iv) medir a imunogenicidade do péptido essencialmente partilhado; e

(v) modificar a sequência do péptido essencialmente partilhado para aumentar a sua imunogenicidade; em que o péptido obtido no passo (v) desencadeia uma resposta citotóxica contra pelo menos dois antigénios da referida família multigénica.

2. Método da reivindicação 1, para identificar um péptido restringido a HLA-B*0702 que pode desencadear uma resposta citotóxica contra pelo menos três antigénios da referida família multigénica, em que o grupo dos péptidos selecionados no passo (iii) compreende péptidos de pelo menos três genes da referida família multigénica.

3. Método da reivindicação 1 ou da reivindicação 2, em que o grupo de péptidos selecionados no passo (iii) compreende pelo menos dois péptidos que possuem diferentes regiões antigénicas.

4. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o péptido essencialmente partilhado selecionado no passo (iii) é um epitopo não-imunogénico com qualquer aminoácido mas P no seu terminal N, e em que o passo (v) consiste em substituir o resíduo C-terminal do referido epitopo com uma leucina.

5. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o péptido essencialmente partilhado selecionado no passo (iii) é um epitopo não-imunogénico com um aminoácido C-terminal selecionado no grupo que consiste em L, A, I, V, M, C e T, e em que o passo (v) consiste na substituição do resíduo N-terminal do referido epitopo por uma alanina.

6. Péptido isolado identificado por um método

de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, em que o referido péptido isolado é selecionado no grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 32 até 67.

7. Polipéptido quimérico, compreendendo um, dois, três ou mais epitopos restringidos a HLA-B*0702 de acordo com a reivindicação 6.

8. Molécula de ácido nucleico isolado concebida para provocar a expressão de um epitopo restringido a HLA-B*0702 de acordo com a reivindicação 6 ou um polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 10.

9. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos, como um princípio ativo, um epitopo restringido a HLA-B*0702 de acordo com a reivindicação 6, ou um polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 7, ou um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8.

10. Composição farmacêutica da reivindicação 9, que é uma vacina.

11. Kit de partes compreendendo, em recipientes separados:

(i) um primeiro péptido compreendendo uma sequência de um epitopo restringido a HLA-B*0702 selecionado no grupo da SEQ ID Nos: 2-31, e

(ii) um segundo péptido compreendendo uma sequência consistindo num epitopo otimizado restringido a HLA-B*0702 selecionado no grupo de SEQ ID Nos: 32-67.

12. Kit de acordo com a reivindicação 11, em que o referido primeiro péptido é um epitopo isolado selecionado no grupo das SEQ ID Nos: 2-31, e o referido segundo péptido é o seu epitopo cognato otimizado.

13. Kit de acordo com a reivindicação 11 ou reivindicação 12, em que o referido primeiro péptido compreende uma sequência selecionada de entre GPRALAETS (SEQ ID No: 15), GPRALIETS (SEQ ID No: 16) e GPRALVETS (SEQ ID No: 17), e o referido segundo péptido compreende a sequência GPRALVETL (SEQ ID No: 54).

14. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, que é um kit de vacinação, em que os referidos primeiro e segundo péptidos ou polipéptido quiméricos estão em doses de vacinação separadas.

Lisboa, 4 de fevereiro de 2015

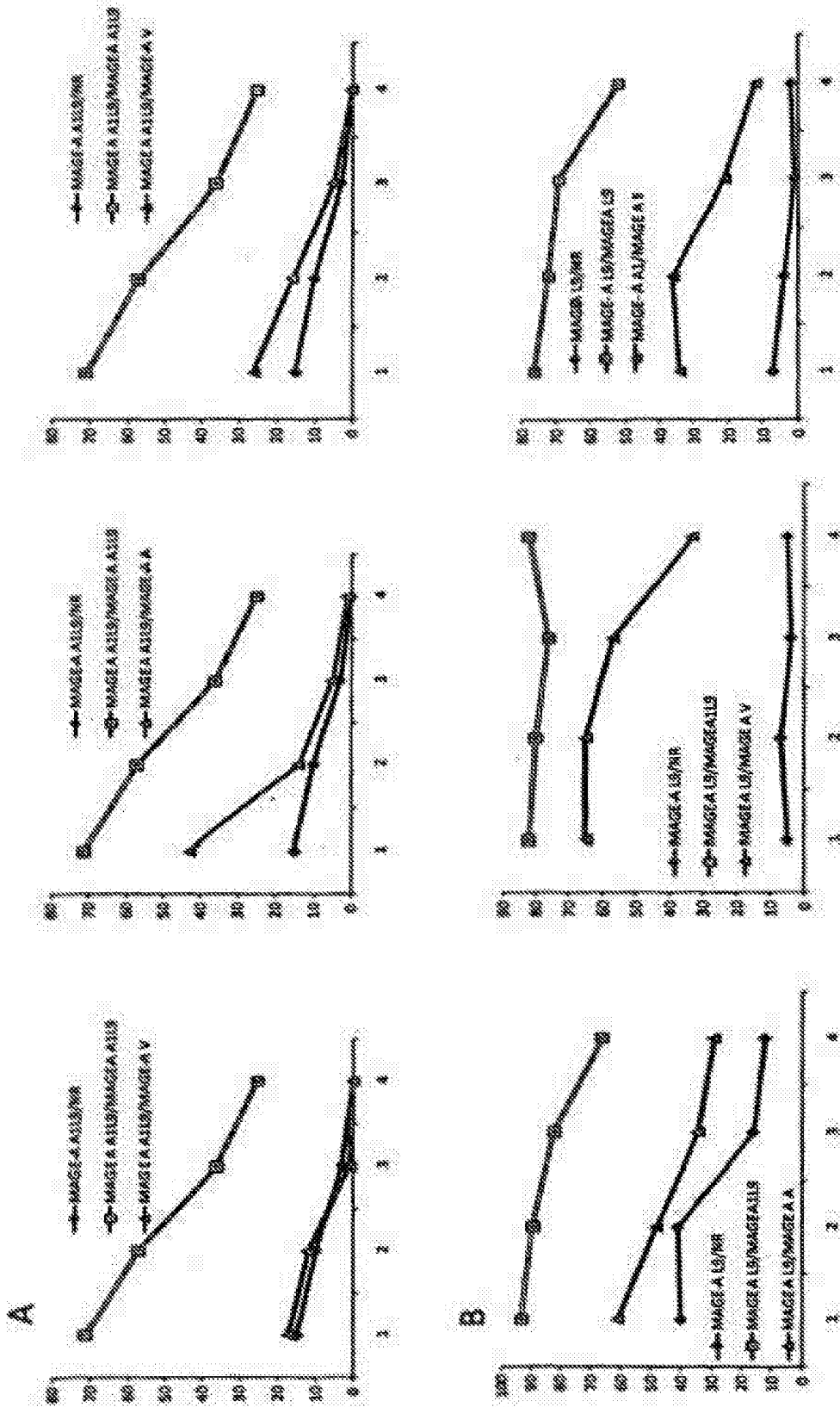


Figure 2

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 0142267 A
- WO 2007073768 A
- EP 1485719 A
- WO 0202716 A
- EP 1309869 A
- WO 2008010010 A
- WO 2008010098 A
- WO 2006120038 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- GRAFF-DUBOIS et al. *Journal of Immunology*, 2002
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Maack Publishing Co
- DE PLAEN, E.; ARDEN, K.; TRAVERSARI, C.; GAFORIO, J.J.; SZIKORA, J.P.; DE SMET, C.; BRASSEUR, F.; VAN DER BRUGGEN, P.; LETHE, B.; LURQUIN, C. et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 1994, vol. 40, 360-369
- GRAFF-DUBOIS S.; FAURE O.; GROSS DA.; ALVES P.; SCARDINO A.; CHOUAIB S.; LEMONNIER FA.; KOSMATOPOULOS K. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*, 2002, vol. 169(1), 575-80
- GROSS, D.A.; GRAFF-DUBOIS, S.; OPOLON, P.; COMET, S.; ALVES, P.; BENNACEUR-GRISCELLI, A.; FAURE, O.; GUILLAUME, P.; FIRAT, H.; CHOUAIB, S. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 2004, vol. 113, 425-433
- MENEZ-JAMET, J.; KOSMATOPOULOS, K. Development of optimized cryptic peptides for immunotherapy. *IDrugs*, 2009, vol. 12, 98-102
- PATERSON, Y.; MACIAG, P.C. Listeria-based vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther*, 2005, vol. 7, 454-460
- ROHRLICH, P.S.; CARDINAUD, S.; FIRAT, H.; LAMARI, M.; BRIAND, P.; ESCRIOU, N.; LEMONNIER, F.A. HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol*, 2003, vol. 15, 765-772
- RUPPERT, J.; SIDNEY, J.; CELIS, E.; KUBO, R.T.; GREY, H.M.; SETTE, A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 1993, vol. 74, 929-937
- TANZARELLA S.; RUSSO V.; LIONELLO I.; DALERBA P.; RIGATTI D.; BORDIGNON C.; TRAVERSARI C. Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (11), 2668-74
- TOURDOT, S.; SCARDINO, A.; SALOUSTROU, E.; GROSS, D.A.; PASCOLO, S.; CORDOPATIS, P.; LEMONNIER, F.A.; KOSMATOPOULOS, K. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol*, 2000, vol. 30, 3411-3421
- VELDERS, M.P.; WEIJZEN, S.; EIBEN, G.L.; ELMISHAD, A.G.; KLOETZEL, P.M.; HIGGINS, T.; CICCARELLI, R.B.; EVANS, M.; MAN, S.; SMITH, L. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*, 2001, vol. 166, 5366-5373