

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2007.07.12</b>	(73) Titular(es): <b>VAXON BIOTECH</b> <b>GENOPOLE 2 RUE GASTON CRÉMIEUX 91057</b> <b>EVRY CEDEX</b> <b>FR</b>
(30) Prioridade(s): <b>2006.07.12 WO</b> <b>PCT/IB2006/002937</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.04.01</b>	(72) Inventor(es): <b>KOSTANTINOS (KOSTAS) KOSMATOPOULOS</b> <b>FR</b> <b>STÉPHANIE GRAFF-DUBOIS</b> <b>FR</b> <b>JEANNE MENEZ-JAMET</b> <b>FR</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.04.02</b> <b>131/2014</b>	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS CRÍPTICOS HLA-B7 PARA IMUNOTERAPIA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AO CAMPO DE IMUNOTERAPIA COM PÉPTIDOS. EM PARTICULAR, A INVENÇÃO PERTENCE A UM MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE UM EPITOPO CRÍPTICO RESTRITO A HLA-B\*0702 NUM ANTIGÉNIO, E A UM MÉTODO PARA AUMENTAR A SUA IMUNOGENICIDADE. A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA NOVOS MÉTODOS E MATERIAIS PARA TRATAR EFICIENTEMENTE DOENTES POSSUINDO UM FENÓTIPO HLAB\* 0702.

**RESUMO**

**"IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS  
CRÍPTICOS HLA-B7 PARA IMUNOTERAPIA"**

A presente invenção refere-se ao campo de imunoterapia com péptidos. Em particular, a invenção pertence a um método para identificação de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 num antigénio, e a um método para aumentar a sua imunogenicidade. A invenção também proporciona novos métodos e materiais para tratar eficientemente doentes possuindo um fenótipo HLAB\* 0702.

**DESCRIÇÃO****"IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS  
CRÍPTICOS HLA-B7 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 possuindo um fenótipo HLA-B\* 0702.

Imunoterapia é uma abordagem terapêutica que é atualmente o objetivo de grande interesse no contexto do tratamento de cancro. O seu princípio é baseado na imunização com péptidos que reproduzem epitopos de célula T de antigénios de tumor reconhecidos por linfócitos T citotóxicos (CTLs) que desempenham um papel principal na eliminação de células de tumor.

Deve ser relembrado que os CTLs não reconhecem antigénios de proteína total, mas os seus fragmentos péptidos, compreendendo geralmente 8 a 11 aminoácidos, apresentados pelas moléculas do complexo de complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) expressos à superfície das células. A apresentação destes péptidos é o resultado do processamento de antigénio que envolve três passos:

- degradação citossólica do antigénio através de um complexo multienzima denominado proteossoma
- translocação dos péptidos derivados desta degradação no retículo endoplasmático (ER) pelos transportadores TAP
- associação destes péptidos com as moléculas MHC I e exportação dos complexos péptido/MHC I para a superfície da célula.

Os complexos péptido/MHC I interagem com o recetor de células T (TCR) específico em CTL induzindo a estimulação e amplificação destes CTL que se tornam capazes de atacar células alvo que expressam o antigénio do qual o péptido é derivado.

Durante o processamento de antigénio, ocorre uma seleção de péptido, que resulta numa hierarquia de apresentação de péptidos. Os péptidos que são preferencialmente apresentados pelas moléculas MHC I são denominadas imunodominantes enquanto os péptidos que são fracamente apresentados são denominados crípticos. Os péptidos imunodominantes exibem uma elevada afinidade para o MHC I e são imunogénico enquanto os péptidos crípticos exibem uma baixa afinidade para MHC I e são não imunogénicos.

Os péptidos imunodominantes foram amplamente alcançados por vacinas de tumor em estudos pré-clínicos e

estudos clínicos com resultados desapontantes (Bowne *et al.*, 1999; Colella *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2004; Hawkins *et al.*, 2000; Naftzger *et al.*, 1996; Overwijk *et al.*, 1998; Vierboom *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1998).

Os antigénios de tumor são frequentemente proteínas próprias sobre-expressas por tumores e expressos em níveis mais baixos por células e tecidos normais. O sistema imunitário é incapaz de reagir contra estes antigénios próprios devido ao processo de autotolerância. A autotolerância refere-se principalmente a péptidos imunodominantes (Cibotti *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2000; Theobald *et al.*, 1997) explicando deste modo a incapacidade destes péptidos para induzir uma imunidade de tumor.

Os péptidos crípticos são muito menos envolvidos no processo de autotolerância (Anderton *et al.*, 2002; Boisgérault *et al.*, 2000; Cibotti *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2004; Moudgil *et al.*, 1999; Overwijk *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2004) e podem, deste modo, induzir uma eficiente imunidade de tumor proporcionando a sua imunogenicidade é melhorada (Disis *et al.*, 2002; Dyall *et al.*, 1998; Engelhom *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2004; Grossmann *et al.*, 2001; Lally *et al.*, 2001; Moudgil e Sercarz, 1994a; Moudgil e Sercarz, 1994b; Palomba *et al.*, 2005).

A estratégia normal para estimular a imuno-

genicidade de péptidos crípticos, que devido à sua baixa afinidade para MHC I são não imunogénicos, consiste em aumentar a sua afinidade para as moléculas MHC I através de substituições de aminoácidos. A afinidade dos péptidos para moléculas MHC I depende principalmente da presença em posições bem definidas (posições de âncora primárias) de resíduos denominados "resíduos de âncora primários". Estes resíduos são específicos para o alelo MHC I. A presença de resíduos de âncora primários embora frequentemente necessária não é suficiente para assegurar uma elevada afinidade para MHC I. foi demonstrado que os resíduos localizados fora das posições de âncora primárias (resíduos de âncora secundários) podem exercer um efeito favorável ou desfavorável na afinidade do péptido para o MHC I (Parker *et al.*, 1994; Rammensee H *et al.*, 1999). A presença destes resíduos de âncora secundários torna possível explicar a existência, nos péptidos possuindo os motivos âncora primários, de uma grande variabilidade na afinidade de ligação.

As substituições de aminoácidos que pretendiam a melhoria na afinidade para a molécula MHC I deve preservar a antigenicidade destes péptidos otimizados. Os CTL produzidos por péptidos otimizados devem reagir de forma cruzada com os correspondentes péptidos nativos.

Muitas equipas foram bem sucedidas na melhoria da imunogenicidade de péptidos já imunogénicos pelo aumento da sua afinidade para HLA-A\*0201 (Bakker *et al.*, 1997;

Parkhurst *et al.*, 1996; Sarobe *et al.*, 1998; Valmori *et al.*, 1998). Os inventores descreveram anteriormente uma estratégia geral para estimular a afinidade e imunogenicidade de péptidos crípticos restritos a HLA-A\*0201 (Scardino *et al.*, 2002; Tourdot *et al.*, 2000).

HLA-B\*0702 é uma molécula frequentemente expressa (25% da população). Identificação e otimização de péptidos crípticos HLAB\* 0702 restritos de tumor devem deste modo ser necessários de modo a desenvolver vacinas de cancro eficientes para doentes que expressam HLA-B\*0702.

Poucos péptidos de tumor apresentados por HLA-B\*0702 foram descritos até à data. Dois péptidos derivados de antigénios CEA (CEA<sub>632</sub>) (Lu *et al.* 2000) e TERT (TERT<sub>1123</sub>) (Cortez-Gonzales *et al.* 2006) foram identificados; estes péptidos exibiram uma forte afinidade de ligação para HLA-B\*0702 e eram imunogénicos em murganhos transgénicos HLA-B\*0702 e em testes *in vitro* com células humanas. Estes resultados experimentais mostram que estes péptidos são péptidos imunodominantes.

Dois péptidos adicionais derivados de MAGE-A1 (MAGE-A1<sub>289</sub>) (Luiten *et al.*, 2000) e RU2 (um novo antigénio expresso por células de carcinoma renal) (Van den Eynde *et al.* 1999) foram identificados como sendo alvos de CTL HLA-B\*0702 que foram isolados de doentes com cancro. Embora não exista informação acerca da afinidade para HLA-B\*0702 destes dois péptidos, podem considerar-se imunodominantes

porque os CTL desenvolvidos em doentes com cancro são sempre direcionados contra péptidos imunodominantes.

Como descrito na parte experimental a seguir, os inventores encontraram agora uma estratégia geral para estimular a afinidade e imunogenicidade de um péptido críptico restrito de HLA-B\*0702.

O presente texto descreve um método para aumentar a imunogenicidade de um epitopo críptico restrito de HLA-B\*0702, compreendendo um passo de substituição do resíduo N-terminal do referido epitopo com uma alanina (A), ou substituição do resíduo C-terminal do referido epitopo com uma leucina (L).

No que se segue, as frases "epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702" é utilizada para designar um péptido, possuindo 8 a 11 aminoácidos, de um modo mais preferido 9 ou 10 aminoácidos, que exhibe uma baixa afinidade para HLA-B\*0702, é não imunogénico e possui a sequência  $X_1PX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (SEQ ID NO: 58), em que P é para prolina,  $X_3$  é R (arginina) ou K (lisina) ou H (histidina) ou M (metionina),  $X_1$  e  $X_4$  to  $X_7$  são independentemente qualquer aminoácido,  $X_8$  to  $X_{10}$  são independentemente qualquer aminoácido ou nenhum, e o aminoácido C-terminal  $X_{11}$  é qualquer aminoácido com a condição de que se o aminoácido N-terminal  $X_1$  é A (alanina) então  $X_{11}$  não é nem L (leucina) nem A, nem I (isoleucina), nem V (valina), e

nem M, e se  $X_1$  é um aminoácido que não A então  $X_{11}$  é L ou A ou I ou V ou M.

No presente texto, o termo "péptido" designa não apenas moléculas em que os resíduos de aminoácidos são ligados por ligações peptídicas (-CO-NH-), mas também pseudopéptidos ou peptidomiméticos sintéticos em que a ligação peptídica é modificada, especialmente para se tornar mais resistente a proteólise, e desde que a sua imunogenicidade não seja prejudicada por esta modificação.

No presente texto, os resíduos de aminoácidos são designados pelos seus códigos de uma letra.

Como aqui utilizado, a palavra "substituição" deve ser entendida como obtenção de um péptido, cuja sequência é derivada da sequência do referido epítipo críptico restrito a HLA-B\*0702 pela substituição mencionada, quando a sequência de aminoácidos do referido epítipo críptico não contém o aminoácido apropriado, qualquer que seja o método técnico utilizado para obter o referido péptido. Por exemplo, o péptido pode ser produzido por síntese de péptido artificial ou por expressão recombinante.

A afinidade de um péptido para HLA-B\*0702 pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pelo ensaio descrito por Rohrllich *et al.*, 2003. Os resultados são expressos como afinidade relativa (RA) quando comparados com um péptido de referência. Seguindo

este método um péptido é referido como tendo uma baixa afinidade para HLA-B\*30702 quando RA é superior a 10. Os péptidos com RA superior a 10 são deste modo considerados péptidos crípticos (ou epitopos):

Como aqui utilizado, o termo "não imunogénico" refere-se a um péptido incapaz de iniciar uma resposta imunitária de CTL restritos a HLA-B\*0702 quando administrados a um indivíduo que expressa HLA-B\*0702 (incluindo um animal transgénico HLA-B\*0702).

Em outra forma de realização, a imunogenicidade de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 em que o segundo e terceiro resíduo de aminoácidos são PR ou PK ou PH ou PM e o último resíduo é L ou A ou I ou V ou M, pode ser aumentado pela substituição do seu primeiro aminoácido por uma A (alanina). De facto, quando a sequência do epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 selecionado é  $X_1PX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (SEQ ID NO: 59), em que o aminoácido N-terminal  $X_1$  é qualquer aminoácido menos A,  $X_3$  é R ou K ou H ou M, o aminoácido C-terminal  $X_{11}$  é L ou A ou I ou V ou M,  $X_4$  a  $X_7$  são independentemente qualquer aminoácido, e  $X_8$  a  $X_{10}$  são independentemente qualquer aminoácido ou nenhum, a substituição de  $X_1$  por A é suficiente para aumentar a sua imunogenicidade.

Ainda em outra forma de realização, a imunogenicidade do epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702s em que os três primeiros resíduos de aminoácidos são APX<sub>3</sub>

(em que  $X_3$  é R ou K ou H ou M) pode ser aumentado por substituição do seu último aminoácido por uma L (ou pela adição de uma leucina no seu terminal C, desde que a sequência de aminoácidos do referido epitopo após ter adicionado a leucina não é mais longa do que 11 aminoácidos). De facto, quando a sequência do epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 selecionado é  $APX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (SEQ ID NO: 60), em que  $X_3$  é R ou K ou H ou M,  $X_4$  a  $X_7$  são independentemente qualquer aminoácido,  $X_8$  a  $X_{10}$  são independentemente qualquer aminoácido ou nenhum, e o aminoácido C-terminal  $X_{11}$  é um outro aminoácido para além de L ou A ou I ou V ou M, a substituição de  $X_{11}$  por L é suficiente para aumentar a sua imunogenicidade.

No que se segue, a expressão "péptido otimizado" designa um péptido imunogénico derivado de um epitopo críptico restrito a HLAB\* 0702, pelos métodos acima, e possuindo a sequência geral  $APX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_8X_{10}X_{11}$  (SEQ ID No: 61), em que  $X_3$  é R ou K ou H ou M,  $X_4$  a  $X_7$  são independentemente qualquer aminoácido,  $X_8$  a  $X_{10}$  são independentemente qualquer aminoácido ou nenhum, e o aminoácido C-terminal  $X_{11}$  é L ou A ou I ou V ou M.

Os inventores identificaram vários epitopos crípticos restritos a HLA-B\*0702, alguns deles são revelados na Tabela I a seguir. De acordo com o exposto, um aspeto da presente invenção é um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702, selecionado entre os péptidos das SEQ ID NO: 2 a 4, revelados na Tabela I.

Tabela I: Péptidos crípticos selecionados restritos a HLA-B\*0702s

Antigénio	Péptido	SEQ ID NO:
TEXT444	DPRRLVQLL	1
HER-2/neu	APRSPLAPS	2
	SPKANKEIL	3
	GPKHSDCLA	4

Exemplos de epitopos imunogénicos restritos a HLA-B\*0702 obtidos de acordo com a presente invenção são os derivados de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 das SEQ ID NOs 3 ou 4, por substituição do seu aminoácido N-terminal com uma A (alanina) e os derivados do epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 de SEQ ID NOs: 2 por substituição do seu aminoácido C-terminal com uma L (leucina).

Deste modo, a presente invenção também pertence ao péptido otimizado derivado dos péptidos crípticos das SEQ ID NOs: 2 a 4, por um método como descrito acima. Os exemplos preferidos dos péptidos otimizados são APRSPLAPL (SEQ ID NO: 6), APKANKEIL (SEQ ID NO: 7) e APKHSDCLA (SEQ ID NO: 8).

A invenção também se refere a um polipéptido quimérico, compreendendo dois, três ou mais epitopos crípticos restritos a HLA-B\*0702s selecionados no grupo consistindo em SEQ ID Nos: 1 a 4, ou dois, três ou mais

epitopos imunogénicos restritos a HLA-B\*0702 selecionados no grupo consistindo em APRRLVQLL (SEQ ID NO: 5) e SEQ ID Nos: 6 a 8 como descrito acima. Num polipéptido quimérico de acordo com a invenção, os epitopos podem ser diferentes entre eles, ou o mesmo epitopo pode ser repetido várias vezes (duas, três ou mais vezes). O especialista da técnica pode escolher qualquer técnica conhecida para produzir estes polipéptidos. Por exemplo, o polipéptido pode ser obtido por síntese química, ou utilizando a tecnologia de engenharia genética.

Outro objeto da presente invenção é uma molécula de ácido nucleico isolado concebido para provocar a expressão de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 selecionado no grupo consistindo nas SEQ ID Nos: 2 a 4 ou um epitopo imunogénico selecionado no grupo consistindo nas SEQ ID Nos: 6 a 8, ou um polipéptido quimérico como acima descrito. Por "concebidos para causar a expressão de um péptido é significa aqui que o referido péptido é expresso como tal, isolado a partir de um antigénio completo do qual a sua sequência foi selecionada (e, em casos apropriados, otimizados como acima descrito), quando o ácido nucleico é introduzido numa célula apropriada. A região codificante para o epitopo ou polipéptido quimérico estará tipicamente situado no polinucleótido sob controlo de um promotor adequado. Os promotores bacterianos serão preferidos para a expressão em bactérias, que podem produzir o polipéptido *in vitro*, ou, em circunstâncias particulares, *in vivo*. Um exemplo de bactéria que pode ser utilizada para produzir um

péptido ou polipéptido de acordo com a invenção, diretamente *in vivo*, é a *Listeria monocytogenes*, que é uma bactéria intracelular facultativa que entra nas células apresentadoras de antígeno profissionais 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, um promotor específico para tecido, um constitutivo forte, ou um endógeno pode ser utilizado para controlar a expressão do péptido. Os sistemas de vetor adequados incluem plasmídeos de DNA nus, composições lipossômicas para estimular a distribuição, e vetores virais que causam a expressão transiente. Exemplificativos são vetores de adenovírus ou vírus vaccinia e vetores da família herpes, especialmente numa forma não replicativa.

Outra forma de realização da presente invenção é uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos, como um princípio ativo, um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 selecionado no grupo consistindo nas SEQ ID Nos: 2 a 4, ou um epitopo imunogénico polipéptido derivado deste como mencionado acima, ou um polipéptido quimérico de acordo com a invenção, ou um ácido nucleico que codifica qualquer destes, e/ou um vetor portador do ácido nucleico. A formulação das composições farmacêuticas estarão de acordo com padrões e técnicas contemporâneos. Os medicamentos pretendidos para administração humana serão preparados em condições adequadamente estéreis, em que os ingrediente(s) ativo(s) são combinados com uma solução isotónica ou outro

veículo farmacêutico apropriado para a utilização terapêutica apropriada. As formulações e técnicas adequadas são geralmente descritas na última edição de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton PA).

Em particular, um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702, ou um epitopo imunogénico polipéptido derivado deste, ou um polipéptido quimérico portador de vários destes epitopos imunogénicos ou crípticos, ou um ácido nucleico que codifica qualquer destes, incluídos ou não num vetor, pode ser utilizada para a preparação de uma composição para imunoterapia preventiva ou curativa, especialmente, para imunoterapia antiviral ou anticancro.

Numa particular forma de realização, a composição farmacêutica de acordo com a invenção é uma vacina. Neste último caso, as composições desta invenção podem ser combinadas com um adjuvante para potenciar a resposta imunitária. Os adjuvantes clássicos incluem emulsões de óleo, como o Adjuvante Incompleto de Freund, e superfícies aderentes como alúmen. Os adjuvantes que recrutam e ativam células dendríticas particularmente via TLR (tal como DNA bacteriano ou proteínas derivadas da membrana bacteriana) ou ajudam a estimular células T citotóxicas são especialmente úteis. Outros fatores que desencadeiam de outro modo a resposta imunitária ou promovem apoptose ou eliminação de células de cancro podem também ser incluídas na composição.

Doses múltiplas e/ou diferentes combinações das composições imunogénicas desta invenção podem ser embaladas para distribuição separadamente ou em conjunto. Cada composição ou conjunto de composições, tais como os kits de partes descritos a seguir, pode ser acompanhada com instruções escritas (na forma de material promocional ou inseridas na embalagem) respeitante à utilização da composição ou combinação na estimulação de uma resposta imunitária e/ou o tratamento de cancro.

Num pedido de patente anterior (PCT/EP2006/005325), o Requerente descreveu um protocolo de vacinação que permite a iniciação e manutenção de uma resposta de célula T direcionada para epitopos crípticos. Os resultados reportados na PCT/EP2006/005325 demonstram que a injeção de um péptido nativo correspondente a um epitopo críptico, 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 restrito a HLA-B\*0702 podem ser deste modo utilizada para a preparação de uma composição medicinal para manutenção da resposta imunitária de CTL iniciada pelo seu péptido otimizado relacionado. Um péptido imunogénico possuindo uma sequência de epitopo otimizado restrito a HLA-B\*0702 derivado de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 pode também ser utilizada, para a preparação de uma composição medicinal para iniciação de uma resposta imunitária de CTL

contra o referido epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702. A presente invenção também inclui um método para vacinação de um doente contra um antigénio tumoral ou viral, em que o referido método compreende um primeiro passo de vacinação com um péptido otimizado relacionado contra um epitopo críptico nativo restrito a HLA-B\*0702 do referido antigénio, seguido por um segundo passo de vacinação com o referido péptido nativo. Neste método, o primeiro passo e/ou o segundo passo pode ser realizado utilizando um polipéptido quimérico compreendendo dois, três ou mais otimizados ou péptidos crípticos como acima-descrito, em vez de péptidos de epitopo único.

A invenção também pertence a um kit de partes compreendendo, em formulações separadas, um primeiro péptido possuindo a sequência de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 selecionado no grupo consistindo nas SEQ ID Nos: 2 a 4, e um segundo péptido derivado do referido primeiro péptido através de um método para aumentar a sua imunogenicidade, como descrito acima.

Outros kits de partes de acordo com a invenção compreendem pelo menos um polipéptido quimérico. Várias variantes destes kits são contempladas: numa primeira forma de realização, o kit compreende, em formulações separadas, a primeiro polipéptido quimérico compreendendo dois, três ou mais epitopos crípticos restritos a HLA-B\*0702s, e um segundo polipéptido quimérico correspondente ao seu polipéptido quimérico imunogénico relacionado restrito a

HLA-B\*0702 (o que significa que compreende epitopos imunogénicos otimizados restritos a HLAB\* 0702 relacionados com o epitopo críptico compreendido no primeiro polipéptido quimérico). Numa segunda forma de realização, o kit compreende um primeiro polipéptido quimérico compreendendo dois, três ou mais epitopos crípticos restritos a HLA-B\*0702 e, em uma ou várias outras formulações separadas, péptidos correspondentes aos epitopos imunogénicos otimizados restritos a HLA-B\*0702 relacionados com o epitopo críptico compreendido no primeiro polipéptido quimérico. Numa terceira forma de realização, o kit compreende dois, três ou mais péptidos correspondentes aos epitopos crípticos distintos restritos a HLA-B\*0702, em que os referidos péptidos estão misturados numa única formulação, ou separadas em várias formulações e, nas formulações separadas, um polipéptido quimérico compreendendo os epitopos imunogénicos otimizados restritos a HLA-B\*0702 relacionados com os referidos péptidos crípticos.

Na descrição que se segue dos kits de acordo com a invenção, serão apenas mencionados os péptidos (nativos ou otimizados), sendo entendido que os polipéptidos quiméricos (compreendendo os epitopos crípticos nativos ou epitopos otimizados) podem ser incluídos nos kits em vez de péptidos de epitopo único.

Numa particular forma de realização da invenção, o kit é um kit de vacinação, em que o referido primeiro (nativo) e segundo (otimizado relacionado) péptidos estão

em doses separadas de vacinação. Numa forma de realização preferida, o kit de vacinação compreende 2 ou 3 doses de péptido otimizado, e 3, 4, 5 ou 6 doses de péptido nativo. Um particular kit de vacinação 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 obtido após esta primo-vacinação, por reforços regulares. Isto pode ser efetuado, por exemplo, por injeções efetuadas a cada 1,5 a 6 meses. Deste modo, os kits complementares, compreendendo pelo menos 2 doses, e até às 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 a 40 ou até 50 doses de péptido nativo. Obviamente, os referidos péptido nativo e otimizado presentes no kit são como descrito acima.

Cada dose compreende entre 0,5 e 10 mg de péptido, de um modo preferido de 1 a 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 a 1,5 mL de uma emulsão de solução aquosa emulsificada com Montanide, utilizada como um adjuvante. O especialista da técnica pode selecionar qualquer outro adjuvante(s) no lugar de (ou em adição a) Montanide. Numa particular forma de realização, 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 de líquido a ser injetada. Outros possíveis componentes dos referidos kits são um ou vários adjuvantes, a ser adicionados às composições de péptido antes da administração, e uma nota descrevendo como utilizar os referidos kits.

A invenção é ainda ilustrada pelas seguintes figuras e exemplos.

**Figura 1: Imunogenicidade de péptidos restritos a HLA-B\*0702.** Os CTL foram testados contra alvos RMA-B7 carregados com péptido como indicado.

**Figura 2: Imunogenicidade de péptidos crípticos otimizados de HLA-B\*0702.** Os CTL foram testados contra alvos RMA-B7 carregados com péptido como indicado.

**Figura 3: Imunogenicidade *in vivo* de péptidos otimizados HLA-B\*0702 Her2/neu1069L9 (A) e Her2/neu1069 (B) em murganhos transgênicos HLA-B\*0702.** Os CTL foram testados contra alvos RMA-B7 targets carregados com péptido como indicado. A população de CTL induzida foi diluída 3 (1), 10 (2), 30 (3) e 100 (4) vezes.

**Figura 4: TERT4 induz CTL específicos para TERT em murganhos HLA-B7 e em dadores saudáveis. (A) imunogenicidade de TERT4 em murganhos transgênicos HLA-B\*0702.** Os CTL foram testados contra alvos RMA-B7 carregados com doses decrescentes de péptido TERT4. **(B)**

**Reconhecimento de TERT endógeno por CTL de murino específico para TERT4.** Os CTL foram testados contra células COS transfetadas com HLA-B\*0702 e TERT como indicado. **(C) Indução de CTLs humanos específicos para TERT4.** Os CTL foram testados contra alvos T2-B7 carregados com TERT4 (■) ou um péptido irrelevante (●) utilizando a proporção Efetor/Alvo como indicado (gráfico à esquerda), e contra as SK-MES-1 positivas para TERT e positivas para HLA-B\*0702 (■), HBL-100 (●) e as SW-480 positivas para TERT e negativas HLA-B\*0702 (□), HSS (o) linhas de células de tumor humano (gráfico à direita).

**Figura 5: Reconhecimento de TERT endógeno por CTL de murino específico para TERT444.** **(A)** Os CTL foram testados contra alvos RMA-B7 carregados com doses decrescentes de péptidos TERT444 ou TERT444A1 como indicado. **(B)** Os CTL foram testados contra células COS transfetadas com HLA-B\*0702 e/ou TERT como indicado.

**Figura 6: Indução de CTLs humanos específicos para TERT444A1.** Os CTLs foram testados contra alvos T2-B7 carregados com péptidos como indicado. A ativação máxima de CTL é obtida por tratamento com PMA/ionomicina.

#### **EXEMPLOS**

Os exemplos foram realizados utilizando os seguintes materiais e métodos:

**Murganhos Transgênicos.** Os murganhos inativados para HLA-B7 H-2 de classe-I foram previamente descritos (Rohrlich *et al.*, 2003). Células RMA-B7 de murino transfectadas com HLA-B\*0702 e células T2-B7 humanas foram previamente descritas (Rohrlich *et al.*, 2003). As células COS-7 e WEHI-164 clone 13 foram proporcionadas por F. Jotereau (INSERM 463, Nantes, França). As linhas de células SK-MES-1 positivas para HLA-B\*0702 (cancro do pulmão), HBL-100 (cancro da mama), e as SW-480 negativas para HLA-B\*0702 (cancro do cólon) e HSS (mieloma) foram utilizadas como alvos de CTL humano. Todas as linhas de células foram cultivadas em meio de cultura RPMI1640 suplementado com FCS a 10%.

**Péptidos e Plasmídeos.** Péptidos foram sintetizados por Epytop (Nîmes, França). O plasmídeo HLA-B\*0702 foi proporcionado por Dr. Lemonnier (Institut Pasteur, Paris, França) (Rohrlich *et al.*, 2003) e o plasmídeo TERT foi proporcionado pelo Dr Weinberg (MIT, Boston, MA) (Meyerson *et al.*, 1997).

**Medição de Afinidade Relativa para Péptido contra HLA-B\*0702.** O protocolo utilizado foi descrito previamente (Rohrlich *et al.*, 2003). Resumidamente, células T2-B7 foram incubadas a 37 °C durante 16 horas com concentrações de péptidos variando de 100 mM a 0,1 mM, e depois coradas com anticorpo monoclonal ME-1 (mAb) para quantificar a expressão à superfície de HLA-B\*0702. Para cada concentração de péptido, a coloração específica para HLA-B\*0702

foi calculada como a porcentagem de coloração obtida com 100 mM do péptido de referência CMV265-274 (R10V; RIPHERNGFTV, SEQ ID NO: 9). A afinidade relativa (RA) foi determinada como:  $RA = \frac{\text{Concentração de cada péptido que induz 20\% de expressão de HLA-B*0702}}{\text{Concentração do péptido de referência que induz 20\% de expressão de HLA-B*0702}}$ .

#### ***Indução de CTL in vivo em Murganhos Transgênicos***

**HLA-B\*0702.** Os murganhos foram injetados subcutaneamente com 100 mg de péptido emulsificado em Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) na presença de 150 mg de epitopo HBVcore128 de auxiliar T restrito a I-Ab (TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO: 10). Após 11 dias,  $5 \times 10^7$  células de baço foram estimuladas *in vitro* com péptido (10 mM). No dia 6 da cultura, a maioria das populações responsivas foram testadas para citotoxicidade específica.

#### ***Ensaio de Processamento de Péptidos em Células***

**COS-7 Transfetadas.** 2.  $2 \times 10^4$  células COS-7 de símios foram plaqueadas em placas de fundo plano de 96 poços em DMEM+10% FCS, em triplicado para cada condição. Dezoito horas mais tarde, as células foram transfetadas com 100 ng de cada DNA plasmídico com DEAE Dextrano. Após 4 horas, PBS+10% DMSO foi adicionado durante 2 minutos. As células COS transfectadas foram incubadas em DMEM+10% FCS durante 40 horas e depois utilizada para estimular CTLs de murino num ensaio de secreção TNF $\alpha$ .

**Ensaio de Secreção de  $TNF\alpha$ .** As células COS-7 transfetadas no dia 4 foram ressuspendidas em 50 mL de RPMI+10% FCS e utilizadas como células estimuladoras.  $5 \times 10^4$  células T de murino foram então adicionados em 50 mL de RPMI 10% de FCS e incubadas durante 6 horas. Cada condição foi testada em triplicado. 50 mL do sobrenadante foi colhida para medir  $TNF\alpha$ . As diluições padrão foram preparadas em 50 mL com doses finais de  $TNF\alpha$  variando de  $10^4$  a 0 mg/mL. Em ambos os sobrenadantes e as diluições padrão, foram adicionadas  $3 \times 10^4$  de células WEHI-164c13 sensíveis a  $TNF\alpha$  em 50 mL. Estas foram incubadas durante 16 h a 37 °C. A inibição da proliferação celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT (Espevik e Nissen-Meyer, 1986).

**Produção de CTL de PBMC humanos.** Os PBMC foram colhidos por leucaferese a partir de voluntários saudáveis HLA-B\*0702. Foram produzidas células dendríticas (DC) a partir de células aderentes cultivadas durante sete dias ( $2 \times 10^6$  células/mL) na presença de 500 IU/mL de GM-CSF e 500 IU/mL IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) em meio completo (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro ANTICORPO humano inativado por calor, 2 mM de L-Glutamina e antibióticos). No dia sete, as DC foram pulsadas com 10 mM de péptidos durante 2 hrs; agentes de maturação Poli I:C (Sigma, Oakville, Canadá) a 100 ng/mL e mAb anti-CD40 (clone G28-5, ATCC, Manassas, VA) a 2 mg/mL foram

adicionados na cultura e as DCs foram incubadas a 37°C durante a noite a 48 horas. As DC maduras foram então irradiadas (3500 rads). As células CD8+ foram purificadas por seleção positiva com MicroBeads CD8 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) de acordo com as instruções do fabricante.  $2 \times 10^5$  células CD8+ +  $6 \times 10^4$  células CD8- foram estimuladas com  $2 \times 10^4$  de DC com péptido pulsado no meio de cultura completo suplementado com 1000 IU/mL de IL-6 e 5 IU/ml de IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN) em placas de 96 poços de fundo redondo. Desde o dia sete, as culturas foram semanalmente reestimuladas com DC carregadas com péptido na presença de 20 IU/mL de IL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, CA) e 10 ng/mL de IL-7 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Após a terceira reestimulação *in vitro*, as culturas de células em conjunto foram testadas quanto a citotoxicidade (TERT4) ou para coloração intracelular IFN $\gamma$  (TERT444A1).

**Ensaio Citotóxico.** Os alvos foram marcados com 100 mCi de Cr<sup>51</sup> durante 60 min, plaqueada em placas de 96 poços de fundo em V ( $3 \times 10^3$  célula/poço em 100 mL de meio RPMI 1640) e, quando necessário, pulsadas com péptidos (1 mM) a 37 °C durante 2 horas. Os efetores foram então adicionados nos poços e incubadas 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.

**Coloração intracelular de IFN $\gamma$ .** As células T ( $10^5$ ) foram incubadas com  $2 \times 10^5$  células T2 carregadas com péptido estimulador na presença de 20 mg/mL de Brefeldin-A (Sigma, Oakville, Canadá). Seis horas mais tarde estas foram lavadas, coradas com anticorpo anti-CD8 conjugado com r-ficoeritrina (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) em PBS durante 25 min a 4 °C, lavadas de novo, e fixadas com 4% de PFA. As células foram então permeabilizadas com PBS, 0,5% de BSA, 0,2% de saponina (Sigma, Oakville, Canadá), e marcadas com um mAb anti-IFN $\gamma$  conjugado com aloficocianina (PharMingen, Mississauga, Canadá) durante 25 min a 4 °C antes da análise com um citómetro de fluxo FACSCalibur®.

### **Exemplo 1: Afinidade dos péptidos**

Oito péptidos com os motivos específicos da âncora HLA-B\*0702, *i. e.* P2 e de um modo preferido L/V na posição C-terminal (Sidney *et al.*, 1996) pertencendo aos antigénios Hsp70 (Hsp<sub>70115</sub>, Hsp<sub>70137</sub>, Hsp<sub>70397</sub>), TERT (TERT<sub>4</sub> e TERT<sub>444</sub>), e MAGE-A (MAGE-A<sub>121.1</sub>, MAGE-A<sub>121.2</sub> e MAGE-A<sub>121.4</sub>) foram testados para a ligação à molécula HLA-B\*0702. Apenas TERT<sub>4</sub> se ligou a HLA-B\*0702 com uma elevada afinidade, os restantes sete péptidos foram ligantes muito fracos ou não ligantes (Tabela II). Isto demonstra que a presença dos motivos de âncora não é suficiente para assegurar a elevada afinidade de ligação a HLA-B\*0702. Dada a sua baixa afinidade, os péptidos Hsp<sub>70115</sub>, Hsp<sub>70137</sub>, Hsp<sub>70397</sub>, TERT<sub>444</sub>,

MAGE-A<sub>121.1</sub>, MAGE-A<sub>121.2</sub>, MAGE-A<sub>121.4</sub>, são **considerados péptidos crípticos**.

**Exemplo 2: Imunogenicidade dos péptidos selecionados**

Os péptidos de baixa afinidade Hsp<sub>137</sub>, Hsp<sub>115</sub>, HSP<sub>397</sub>, TERT<sub>444</sub> e de elevada afinidade TERT<sub>4</sub> foram testados quanto à sua capacidade para induzir uma resposta imunitária específica de CTL em murganhos transgênicos HLA-B\*0702. Apenas o TERT4 de elevada afinidade foi imunogênico confirmando que a imunogenicidade de péptidos é fortemente relacionada com a sua afinidade para HLA (Figura 1).

Tabela II: Afinidade para HLA-B\*0702 de péptidos

	péptido	sequência	RA	SEQ ID No
1	Hsp70 115	YP EEISSMVL	>10	11
	Hsp70 115A1	AP EEISSMVL	>10	12
2	Hsp70 137 (10)	YPVTNAVITV	>10	13
3	Hsp70 397	APLSLGLLET	>10	14
4	TERT4	APRCRAVRSL	0,74	15
5	TERT444	DPRRLVQLL	>10	1
	TERT 444A1	APRRLVQLL	1,4	5
6	MAGE-A121.1	EPVTKAEML	>10	16
	MAGE-121.1 A1	APVTKAEML	>10	17
7	MAGE-A121.2	EPFTKAEML	>10	18
8	MAGE-A121.4	EPITKAEIL	>10	19

### **Exemplo 3: Melhoria da Afinidade de Péptidos de Baixa Afinidade**

Uma vez que todos estes péptidos crípticos tinham motivos de âncora primários favoráveis, a melhoria da sua afinidade é um pré-requisito para que sejam imunogénicos. Requerem a identificação de motivos de âncora secundários desfavoráveis e a sua substituição com motivos favoráveis. Estas substituições devem contudo preservar a conformação do segmento do péptido que interage com o TCR (posição 4 à posição 8). O interesse esteve, deste modo, focado nas posições secundárias da âncora 1 e 3: os aminoácidos alifáticos são motivos favoráveis na posição 1 (Sidney, Southwood *et al.*, 1996). No entanto, os péptidos Hsp<sub>70115</sub> e Hsp<sub>70137</sub> que possuem um Y (tirosina) na posição 1 são não ligantes. Além disso, a substituição do aminoácido na posição 1 por uma A (alanina) que é também favorável nesta posição. (Parker *et al.*, 1994) melhora a afinidade do TERT444 mas não a dos péptidos Hsp<sub>70115</sub> e MAGE-A121.1 (Tabela II). Isto indica que a presença de aminoácidos favoráveis na posição 1 e posições de âncora 2 e 9/10 **não podem assegurar por si só uma elevada afinidade de ligação de todos os péptidos.** Por outro lado, péptidos positivamente carregados (R/H/K) foram descritos como sendo favoráveis na posição 3 (Sidney *et al.*, 1996) e dez de 26 péptidos imunogénicos derivados de tumor e HIV identificados possuem um R/K/H na posição 3 (Tabela III).

Tabela III: epitopos derivados de Tumor  
e HIV restritos a HLA-B\*0702

Antigénio	sequência	SEQ ID NO:	referência
NY-ESO- 1	APRGVRMAV	20	Slager <i>et al.</i> , 2004
ICE	SPRWPTCL	21	Ronsin <i>et al.</i> , 1999
RAGE-1	SPSSNRIRNT	22	Gaugler <i>et al.</i> , 1996
RU2AS	LPRWPPPQL	23	Van Den Eynde <i>et al.</i> , 1999
RBAF500	RPHVPESAF	24	Lennerz <i>et al.</i> , 2005
proteína de fusão SSX2	QPRYGYDQIM	25	Worley <i>et al.</i> , 2001
HIVp17	REGGKKRYKL	26	HIV Molecular Immunology Database (Operada por Los Alamos National Security, LLC, para o U.S. Department of Energy's National Nuclear Security Administration)  <a href="http://hivweb.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl_summary.html">http://hivweb.lanl.gov/content/ immunology/tables/ctl_summary.html</a>
HIVp24	SPRTLNAWV	27	
HIVp24	HPVHAGPIA	28	
HIVp24	PPIPVGEIY	29	
HIVp24	GPGHKARVL	30	
HIV-RT	SPIETVPEVKL	31	
HIV-RT	GPKVKQWPLT	32	
HIV-RT	SPAIFQSSM	33	
HIV-RT	IPLTEEAEL	34	
HIV-RT	QPKSESELV	35	
HIV-Vif	HPRISSEVHI	36	
HIV-Vif	KPPLPSVKKL	37	
HIV-Vif	FPRTWLHGL	38	
HIVgp 160	KECVKLTPLC	39	
HIVgp160	KVVSTQLLL	40	
HIVgp160	RPWNNTRKSI	41	
HIVgp160	IPRRIRQGL	42	
HIVnef	FPVTPQVPL	43	
HIVnef	TPQVPLRPM	44	

De acordo com todas estas observações, os péptidos com a sequência APX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> (SEQ ID N° 61) deve ter uma elevada afinidade para HLA-B\*0702. Isto é

confirmado por resultados apresentados na Tabela IV. Todos os dezoito péptidos com a sequência acima citada têm uma elevada afinidade e/ou foram imunogênicos em murganhos transgênicos HLA-B\*0702.

**Exemplo 4: In vivo Imunogenicidade de péptidos com afinidade melhorada e reconhecimento da parte nativa**

Murganhos transgênicos HLA-B7 foram vacinados com os péptidos selecionados, e onze dias mais tarde, as suas células do baço foram estimuladas *in vitro* com o péptido.

Neste contexto, Hsp<sub>70115</sub>, Hsp<sub>70397</sub> e TERT<sub>444</sub>, foram deste modo modificados na posição 1 (substituição do aminoácido por uma A) e/ou posição 3 (substituição do aminoácido por um R). Para o péptido Hsp<sub>70397</sub> foi introduzida uma modificação adicional na posição C-terminal (substituição do T por um L). Os péptidos modificados, *i. e.* Hsp<sub>70115A1R3</sub> (SEQ ID NO: 55), Hsp<sub>70397R3L9</sub> (SEQ ID NO: 56), TERT<sub>444A1</sub> (SEQ ID NO: 5) exibiram uma forte afinidade para HLA-B\*0702 (Tabela IV) e induziram uma resposta imunitária na maioria dos murganhos vacinados (Figura 2). No entanto, para todos os péptidos menos TERT<sub>444A1</sub>, os CTL produzidos **reconheceram o péptido otimizado mas não o correspondente péptido nativo** (Figura 2). Isto sugere fortemente que a substituição do aminoácido na posição 3 por um R pode alterar a conformação do segmento péptido que interage com o TCR e garante o reconhecimento cruzado de TCR.

Uma vez que a) todos os péptidos testados com APX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> têm uma elevada afinidade e são imunogénicos (Tabela IV e Figura 1, 2) e b) substituição do aminoácido na posição 3 por um R pode quebrar o reconhecimento cruzado do péptido nativo, os inventores selecionaram péptidos nativos possuindo um P e R nas posições 2 e 3 respetivamente, e estes substituíram o aminoácido na posição 1 por uma A se o último aminoácido foi favorável (L, A, I, V ou M). Dada a elevada importância da posição 3 na afinidade e reconhecimento de péptidos restritos a HLA-B\*0702 de CTL, os inventores selecionaram péptidos com a sequência X<sub>1</sub>PX<sub>3</sub> (em que X<sub>1</sub> é qualquer aminoácido e X<sub>3</sub> é K, R, H ou M; estes aminoácidos foram descritos como sendo resíduos favoráveis na posição 3) e um aminoácido favorável (A/I/L/V) na posição C-terminal. Os péptidos com esta sequência e baixa afinidade para HLA-B\*0702 foram modificados por substituição do primeiro resíduo por um A. Este é o caso de TERT<sub>444</sub>, Her-2/neu<sub>760</sub> e Her-2/neu<sub>246</sub>. Os inventores também selecionaram péptidos com a sequência APX<sub>3</sub> (em que X<sub>3</sub> é K, R, H ou M) e um resíduo não favorável na posição C-terminal (*i.e.*, um outro aminoácido que não L, A, I, V ou M). Os péptidos com esta sequência e baixa afinidade para HLA-B\*0702 foram modificados por substituição do resíduo na posição C-terminal por um L. este é o caso de Her-2/neu<sub>1069</sub>. Todos estes péptidos modificados tinham uma forte afinidade para HLA-B\*0702.

Tabela IV: Afinidade e imunogenicidade de péptidos APX3X4X5X6X7X8X9X10X11 restritos a HLA-B\*0702. - = RA>10, + = 1<RA<10, ++ = RA<1, Imunogenicidade foi testada como descrito no Exemplo 2. +: significa que uma imunorresposta específica foi produzida em pelo menos um murganho transgênico HLA-B\*0702, ND : Não Determinado

Sequência	SEQ ID NOs	RA	Imunogenicidade
APRRLVQLL	5	+	+
APRSPLAPL	6	++	+
APKANKEIL	7	ND	+
APKHSDCLA	8	ND	+
APRCRAVRSL	15	+	+
APRMHCAVDL	45	++	+
APRVSIRLPL	46	++	ND
APREYVNAL	47	+	+
APRGVPQIEL	48	ND	+
APRALVETL	49	+	+
APRMPEAAL	50	ND	+
APRRRLGCEL	51	+	+
APRPWTPCL	52	+	+
APRASSPLL	53	ND	+
APRQLGREL	54	ND	+
APREISSMVL	55	+	+
APRSLGLEL	56	++	+
APRTKAEML	57	+	+

**Exemplo 5: Imunogenicidade do péptido otimizado e reconhecimento cruzado da parte nativa**

Os péptidos nativos Her2/neu<sub>246</sub>, Her2/neu<sub>760</sub>, Her2/neu<sub>1069</sub> e TERT<sub>444</sub> não foram imunogénicos, enquanto os péptidos otimizados foram imunogénicos em murganhos transgénicos HLA-B\*0702. Além disso, os CTL induzidos por todos estes péptidos otimizados foram capazes de reagir de forma cruzada com o correspondente péptido nativo (Figura 3 e Tabela V).

Péptido	Sequência	SEQ ID NOs:	Imunogenicidade	Péptido nativo correspondente a reconhecimento cruzado
TERT444	DPRRLVQLL	1	-	
TERT444A1	APRRLVQLL	5	+	+
Her2/neu <sub>760</sub>	APKANKEIL	3	-	
Her2/neu <sub>760A1</sub>	APKANKEIL	7	+	+
Her2/neu <sub>246</sub>	GPKHSDCLA	4	-	
Her2/neu <sub>246A1</sub>	APKHSDCLA	8	+	+
Her2/neu <sub>1069</sub>	APRSPLAPS	2	-	
Her2/neu <sub>1069L9</sub>	APRSPLAPL	6	+	+

Tabela V: Imunogenicidade de péptidos nativos e otimizados restritos a HLA-B\*0702. + para imunogenicidade ou reconhecimento cruzado do péptido nativo significa que o péptido induziu uma resposta específica em pelo menos um murganho transgénico HLA-B\*0702, capaz de reconhecer o correspondente péptido nativo.

Em conclusão, os inventores descreveram um método para otimizar a imunogenicidade (e também afinidade) de

péptidos crípticos restritos a HLAB\* 0702. Consiste em a) substituição do resíduo na posição 1 com uma A em todos os péptidos compreendendo a sequência  $X_1PX_3$  (em que  $X_1$  é qualquer aminoácido exceto A e  $X_3$  é R ou K ou H ou M), um aminoácido favorável na posição C-terminal (*i.e.*, L ou A ou I ou V ou M), e a baixa afinidade for HLA-B\*0702, ou b) substituição do resíduo na posição C-terminal com um L em péptidos compreendendo a sequência  $APX_3$  (sendo  $X_3$  definido como acima), um resíduo não favorável na posição C-terminal (*i.e.*, um outro aminoácido para além de L ou A ou I ou V ou M), e uma baixa afinidade para HLA-B\*0702.

**Exemplo 6: Péptido imunodominantes TERT<sub>4</sub> induz CTL específicos para TERT**

Os murganhos transgênicos HLA-B7 foram então imunizados com o TERT4 (SEQ ID NO: 15) e onze dias mais tarde as suas células do baço foram estimuladas *in vitro* com o péptido. Os CTLs produzidos mataram os alvos RMA-B7 carregados com concentrações decrescentes de péptido TERT<sub>4</sub> (Figura 4A). A semi-lise máxima de alvos carregados com TERT<sub>4</sub> foi obtida com 1,5 nM (Figura 4A). Os CTL foram então testados quanto à sua capacidade para reconhecer células COS-7 que expressam HLA-B\*0702 e TERT endógena. Os resultados apresentados na Figura 4B mostram que os CTL reconhecem células COS-7 transfetadas com HLA-B\*0702 e TERT mas não com células COS-7 transfetadas com HLA-B\*0702 ou TERT, demonstrando que o péptido dominante TERT<sub>4</sub> é um epitopo restrito a HLA-B\*0702 processado naturalmente a

partir de TERT endógeno. Além disso, as células CD8 de dadores saudáveis foram estimuladas *in vitro* com células dendríticas autólogas carregadas com péptido TERT<sub>4</sub>. Após quatro estimulações, os CTL foram testados para testar a citotoxicidade contra alvos T2-B7 carregados com TERT<sub>4</sub>. Três dadores foram testados e os CTL foram induzidos em dois deles. Os resultados de um dador responsivo são apresentados na Figura 4C. Os alvos T2-B7 mortos por CTL apresentam TERT<sub>4</sub> mas não células T2-B7 que apresentam o irrelevante péptido Nef (gráfico à esquerda). De uma forma interessante, SK-MES-1 HLA-B\*0702 TERT+ e HBL-100 mortos por CTL mas não as SW-480 HLA-B\*0702-TERT+ e as linhas de células de tumor humano HSS confirmando que a apresentação restrita a HLA-B\*0702 e o processamento endógeno do epitopo TERT<sub>4</sub> (gráfico à direita).

#### **Exemplo 7: CTL Induzidos por Péptidos TERT<sub>444A1</sub> Reconhecem TERT Endógeno**

O TERT<sub>444A1</sub> (SEQ ID NO: 5) foi testado quanto à sua capacidade para induzir CTL capazes de reconhecer TERT endógeno e para induzir os CTL em dadores saudáveis (Exemplo 6). Os murganhos transgênicos HLA-B\*0702 foram então imunizados com o TERT<sub>444A1</sub> e onze dias mais tarde as suas células do baço foram estimuladas *in vitro* com o péptido nativo TERT<sub>444</sub> (SEQ ID NO: 1). Os CTL produzidos mataram alvos RMA-B7 carregados produzidos com concentrações decrescentes de péptidos TERT<sub>444A1</sub> e TERT<sub>444</sub>. A lise semi-máxima de alvos carregados com TERT<sub>444</sub> e carregados com

TERT<sub>444A1</sub> foi obtida com 5,5 nM e 1 nM respectivamente (Figura 5A). Os CTL foram então testados quanto à sua capacidade para reconhecer células COS-7 que expressam HLA-B\*0702 e TERT endógeno. Os resultados apresentados na Figura 5B mostram que os CTL reconhecem células COS-7 transfetadas com HLA-B\*0702 e TERT mas não células COS-7 transfetadas com HLA-B\*0702 ou TERT demonstrando que TERT<sub>444</sub> é um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 naturalmente processado a partir de TERT endógeno.

#### **Exemplo 8: TERT<sub>444A1</sub> Estimula CTLs de Dadores Saudáveis**

As células CD8 de dadores saudáveis foram estimuladas *in vitro* com células dendríticas autólogas carregadas com péptido TERT<sub>444A1</sub>. Após quatro estimulações, as células em proliferação foram divididas em 4 misturas. Cada mistura foi então testada quanto à produção intracelular de IFN $\gamma$  após estimulação com células T2-B7 carregadas com TERT<sub>444A1</sub> otimizado ou TERT<sub>444</sub> nativo. Os resultados do dador responsivo D5609 são apresentados na Figura 6. Os CTL que produzem IFN $\gamma$  foram detetados nas misturas 2 e 4 após estimulação com células T2B7 carregadas com TERT<sub>444</sub> ou TERT<sub>444A1</sub> (Figura 6).

#### **REFERÊNCIAS**

Anderton, S. M., Viner, N. J., Matharu, P., Lowrey, P. A., and Wraith, D. C. (2002). Influence of a

dominant cryptic epitope on autoimmune T cell tolerance. *Nat Immunol* 3, 175-181.

Bakker, A. B., van der Burg, S. H., Huijbens, R. J., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Adema, G. J., and Figdor, C. G. (1997). Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild-type epitope. *Int J Cancer* 70, 302-309.

Boisgérault, F., Anosova, N. G., Tam, R. C., Illigens, B. M., Fedoseyeva, E. V., and Benichou, G. (2000). Induction of T-cell response to cryptic MHC determinants during allograft rejection. *Hum Immunol* 61, 1352-1362.

Bowne, W. B., Srinivasan, R., Wolchok, J. D., Hawkins, W. G., Blachere, N. E., Dylla, R., Lewis, J. J., and Houghton, A. N. (1999). Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. *J Exp Med* 190, 1717-1722.

Cibotti, R., Kanellopoulos, J. M., Cabaniols, J. P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E., and Kourilsky, P. (1992). Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 416-420.

Colella, T. A., Bullock, T. N., Russell, L. B., Mullins, D. W., Overwijk, W. W., Luckey, C. J., Pierce, R.

A., Restifo, N. P., and Engelhard, V. H. (2000). Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med* 191, 1221-1232.

Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2006). Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTRT. *Int Immunol* 18, 1707-1718.

Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkom, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L., and Schiffman, K. (2002). Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptidebased vaccines. *J Clin Oncol* 20, 2624-2632.

Dyall, R., Bowne, W. B., Weber, L. W., LeMaoult, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J. J., Houghton, A. N., and Nikolic-Zugic, J. (1998). Heteroclitic immunization induces tumor immunity. *J Exp Med* 188, 1553-1561.

Engelhom, M. E., Guevara-Patino, J. A., Noffz, G., Hooper, A. T., Lou, O., Gold, J. S., Kappel, B. J., and Houghton, A. N. (2006). Autoimmunity and tumor immunity induced by immune responses to mutations in self. *Nat Med* 12, 198-206.

Espevik, T., and Nissen-Meyer, J. (1986). A

highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95, 99-105.

Friedman, R. S., Spies, A. G., and Kalos, M. (2004). Identification of naturally processed CD8 T cell epitopes from prostein, a prostate tissue-specific vaccine candidate. *Eur J Immunol* 34, 1091-1101.

Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P., Van den Eynde, B. J. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. (1996) *Immunogenetics* 44, 323-30

Gross, D. A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Comet, S., Alves, P., Bennaceur-Griscelli, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., et al. (2004). High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 113, 425-433.

Grossmann, M. E., Davila, E., and Celis, E. (2001). Avoiding Tolerance Against Prostatic Antigens With Subdominant Peptide Epitopes. *J Immunother* 24, 237-241.

Hawkins, W. G., Gold, J. S., Dyal, R., Wolchok, J. D., Hoos, A., Bowne, W. B., Srinivasan, R., Houghton, A. N., and Lewis, J. J. (2000). Immunization with DNA coding

for gp100 results in CD4 T-cell independent antitumor immunity. *Surgery* 128, 273-280.

Hernandez, J., Lee, P. P., Davis, M. M., and Sherman, L. A. (2000). The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J Immunol* 164, 596-602.

Lally, K. M., Mocellin, S., Ohnmacht, G. A., Nielsen, M. B., Bettinotti, M., Panelli, M. C., Monsurro, V., and Marincola, F. M. (2001). Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading. *Int J Cancer* 93, 841-847.

Lennerz V., Fatho M., Gentilini C., Frye R. A., Lifke A., Ferel D., Wölfel C., Huber C., Wölfel T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *PNAS U.S.A.* 102, 16013-8.

Lu, J., Celis, E. (2000). Use of two predictive algorithms of the world wide web for the identification of tumor-reactive T-cell epitopes. *Cancer Res.* 60, 5223-5227.

Luiten, R., van der Bruggen, P. (2000). A MAGE-A1 peptide is recognized on HLA-B7 human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue antigens* 55, 149-152.

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L.,

Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.

Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1994a). Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol Today* 15, 353-355.

Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1994b). The T cell repertoire against cryptic self determinants and its involvement in autoimmunity and cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 73, 283-289.

Moudgil, K. D., Southwood, S., Ametani, A., Kim, K., Sette, A., and Sercarz, E. E. (1999). The self-directed T cell repertoire against mouse lysozyme reflects the influence of the hierarchy of its own determinants and can be engaged by a foreign lysozyme. *J Immunol* 163, 4232-4237.

Naftzger, C., Takechi, Y., Kohda, H., Hara, I., Vijayasaradhi, S., and Houghton, A. N. (1996). Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 14809-14814.

Overwijk, W. W., Theoret, M. R., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., de Jong, L. A., Vyth-Dreese, F. A., DelleMijn, T. A., Antony, P. A., Spiess, P. J., Palmer, D.

C., et al. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198, 569-580.

Overwijk, W. W., Tsung, A., Irvine, K. R., Parkhurst, M. R., Goletz, T. J., Tsung, K., Carroll, M. W., Liu, C., Moss, B., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1998). gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med* 188, 277-286.

Palomba, M. L., Roberts, W. K., Dao, T., Manukian, G., Guevara-Patino, J. A., Wolchok, J. D., Scheinberg, D. A., and Houghton, A. N. (2005). CD8+ T-cell-dependent immunity following xenogeneic DNA immunization against CD20 in a tumor challenge model of B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 11, 370-379.

Parker, K.C., Bednarek, M.A., Coligan J.E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 152, 163-175.

Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Kawakami, Y. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. *J Immunol* 157, 2539-2548.

Paterson, Y., and Maciag, P. C. (2005). Listeria-based vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther* 7, 454-460.

Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O.A., Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 50, 213-219.

Rohrlich, P. S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N., and Lemonnier, F. A. (2003). HLAB\* 0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* 15, 765-772.

Ronsin, C., Chung-Scott, V., Poullion, I., Aknouche, N., Gaudin, C., Triebel, F. (1999). A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *J Immunol* 163, 483-90

Sarobe, P., Pendleton, C. D., Akatsuka, T., Lau, D., Engelhard, V. H., Feinstone, S. M., and Berzofsky, J. A. (1998). Enhanced in vitro potency and in vivo immunogenicity of a CTL epitope from hepatitis C virus core protein following amino acid replacement at secondary HLA-A2.1 binding positions. *J Clin Invest* 102, 1239-1248.

Scardino, A., Gross, D. A., Alves, P., Schultze, J. L., Graff-Dubois, S., Faure, O., Tourdot, S., Chouaib, S., Nadler, L. M., Lemonnier, F. A., et al. (2002). HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* 168, 5900-5906.

Sidney, J., Southwood, S., del Guercio, M. F., Grey, H. M., Chesnut, R. W., Kubo, R. T., and Sette, A. (1996). Specificity and degeneracy in peptide binding to HLA-B7-like class I molecules. *J Immunol* 157, 3480-3490.

Sinha, P., Chi, H. H., Kim, H. R., Clausen, B. E., Pederson, B., Sercarz, E. E., Forster, I., and Moudgil, K. D. (2004). Mouse lysozyme-M knockout mice reveal how the self-determinant hierarchy shapes the T cell repertoire against this circulating self antigen in wild-type mice. *J Immunol* 173, 1763-1771.

Slager, E.H., van der Minne, C.E., Goudsmit, J., van Oers J., M., Kostense, S., Havenga, M.J., Osanta, S., and Griffioen, M. (2004). Induction of CAMEL/NY-ESO-ORF2-specific CD8+ T cells upon stimulation with dendritic cells infected with a modified Ad5 vector expressing a chimeric Ad5/35 fiber. *Cancer Gene Ther* 11, 227-236.

Theobald, M., Biggs, J., Hernandez, J., Lustgarten, J., Labadie, C., and Sherman, L. A. (1997). Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185, 833-841.

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.

Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160, 1750-1758.

Van Den Eynde, B. J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P., Boon, T. (1999). A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med* 190, 1793-1800.

Vierboom, M. P., Nijman, H. W., Offringa, R., van der Voort, E. I., van Hall, T., van den Broek, L., Fleuren, G. J., Kenemans, P., Kast, W. M., and Melief, C. J. (1997). Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 186, 695-704.

Weber, L. W., Bowne, W. B., Wolchok, J. D., Srinivasan, R., Qin, J., Moroi, Y., Clynes, R., Song, P.,

Lewis, J. J., and Houghton, A. N. (1998). Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J Clin Invest* 102, 1258-1264.

Worley, B.S., van den Broeke, L.T., Goletz, T.J., Pendleton C.D., Daschbach, E.M., Thomas E.K., Marincola, F.M., Helman L.J., and Berzofsky, J.A. (2001). Antigenicity of fusion proteins from sarcoma-associated chromosomal translocations. *Cancer Res* 61, 6868-6875.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

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

<120> IDENTIFICAÇÃO, OPTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EPITOPOS CRÍPTICOS DE HLA-B7 PARA IMUNOTERAPIA

<130> VMA/bv-F1788/3PCT

<150> PCT/IB2006/002937

<151> 2006-07-12

<160> 61

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TERT

<400> 1

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu  
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HER-2/neu

<400> 2

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser  
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> epitopo críptico HER-2/neu de HLA-B7

<400> 3

Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> epitopo críptico HER-2/neu de HLA-B7

<400> 4

Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> TERT

<400> 5

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Her-2/neu

<400> 6

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Leu  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> epitopo imunogénico derivado de Her-2/neu

<400> 7

Ala Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido imunogénico derivado de Her-2/neu

<400> 8

Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala  
1 5

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido

<400> 9

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

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

<220>  
<223> Péptido

<400> 10

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu  
1 5 10

PE2041160

- 47 -

<210> 11  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Hsp70\_115

<400> 11

Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu  
1 5 10

<210> 12  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> 115A1

<400> 12

Ala Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu  
1 5 10

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

<220>  
<223> Hsp70 137 (10)

<400> 13

Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile Thr Val  
1 5 10

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Hsp70 397

<400> 14

Ala Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Thr  
1 5

<210> 15

PE2041160

- 48 -

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

<220>  
<223> TERT4

<400> 15

Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu  
1 5 10

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

<220>  
<223> MAGE-A121.1

<400> 16

Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> 121.1 A1

<400> 17

Ala Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu  
1 5

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> MAGE-A121.2

<400> 18

Glu Pro Phe Thr Lys Ala Glu Met Leu  
1 5

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MAGE-A121.4

<400> 19

Glu Pro Ile Thr Lys Ala Glu Ile Leu  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> NY-ESO-1

<400> 20

Ala Pro Arg Gly Val Arg Met Ala Asn  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ICE

<400> 21

Ser Pro Arg Trp Trp Pro Thr Cys Leu  
1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> RAGE-1

<400> 22

Ser Pro Ser Ser Asn Arg Ile Arg Asn Thr  
1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> RU2AS

&lt;400&gt; 23

Leu Pro Arg Trp Pro Pro Pro Gln Leu  
 1 5

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; RBAF500

&lt;400&gt; 24

Arg Pro His Val Pro Glu Ser Ala Phe  
 1 5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; protein de fusão SSX2

&lt;400&gt; 25

Gln Pro Arg Tyr Gly Tyr Asp Gln Ile Met

1

5

10

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIVp17

&lt;400&gt; 26

Arg Pro Gly Gly Lys Lys Arg Tyr Lys Leu  
 1 5 10

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIVp24

&lt;400&gt; 27

Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val  
1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIVp24

&lt;400&gt; 28

His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIVp24

&lt;400&gt; 29

Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIVp24

&lt;400&gt; 30

Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu  
1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIV-RT

&lt;400&gt; 31

Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu  
 1 5 10

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> HIV-RT

<400> 32

Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr  
 1 5 10

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

<220>  
 <223> HIV-RT

<400> 33

Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met  
 1 5

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

<220>  
 <223> HIV-RT

<400> 34

Ile Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu  
 1 5

<210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> HIV-RT

<400> 35

Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu Val  
 1 5 10

<210> 36  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> HIV-Vif

<400> 36

His Pro Arg Ile Ser Ser Glu Val His Ile  
1 5 10

<210> 37  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> HIV-Vif

<400> 37

Lys Pro Pro Leu Pro Ser Val Lys Lys Leu  
1 5 10

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

<220>  
<223> HIV-Vif

<400> 38

Phe Pro Arg Thr Trp Leu His Gly Leu  
1 5

<210> 39  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> HIVgp160

<400> 39

Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys  
1 5 10

<210> 40  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HIVgp160

<400> 40

Lys Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu  
1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HIVgp160

<400> 41

Arg Pro Trp Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile  
1 5 10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HIVgp160

<400> 42

Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu  
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HIVnef

<400> 43

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> HIVnef

<400> 44

Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met  
1 5

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

<220>  
<223> EphA2

<400> 45

Ala Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Leu  
1 5 10

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

<220>  
<223> EphA2

<400> 46

Ala Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro Leu  
1 5 10

<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Her-2/neu

<400> 47

Ala Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Leu  
1 5

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

<220>  
<223> Péptido artificial

<400> 48

Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Leu  
1 5 10

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220> <223> MAGE-A

<400> 49

Ala Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu  
1 5

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido artificial

<400> 50

Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala Leu  
1 5

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

<220>  
<223> TERT

<400> 51

Ala Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Leu  
1 5 10

<210> 52  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido artificial

<400> 52

Ala Pro Arg Pro Trp Thr Pro Cys Leu  
1 5

<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 53

Ala Pro Arg Ala Ser Ser Pro Leu Leu  
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido artificial

<400> 54

Ala Pro Arg Gln Leu Gly Arg Glu Leu  
1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 115A1R3

<400> 55

Ala Pro Arg Glu Ile Ser Ser Met Val Leu  
1 5 10

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 397R3L9

<400> 56

Ala Pro Arg Ser Leu Gly Leu Glu Leu  
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 121.1 A1R3

<400> 57

Ala Pro Arg Thr Lys Ala Glu Met Leu  
1 5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(1)

<223> Xaa é qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa é Arg ou Lys ou His ou Met

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (4)..(7)

<223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (8)..(10)

<223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre naturalmente ou nenhum

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (11)..(11)

<223> Xaa é qualquer aminoácido que ocorre naturalmente com a condição de que se Xaa (1)..(1) é Ala então Xaa (11)..(11) não é Leu nem Ala nem Ile nem Val e nem Met; e se Xaa (1)..(1) não é Ala então Xaa (11)..(11) é Leu ou Ala ou Ile ou Val ou Met

<400> 58

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa é qualquer aminoácido que ocorre naturalmente para além de Ala

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa é Arg ou Lys ou His ou Met

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (4)..(7)  
 <223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (8)..(10)  
 <223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre naturalmente ou nenhum

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa é Leu ou Ala ou Ile ou Val ou Met

<400> 59

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10

<210> 60  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa é Arg ou Lys ou His ou Met <220> <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (4)..(7) <223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre naturalmente

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (8)..(10)  
 <223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre naturalmente ou nenhum

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (11)..(11)

<223> Xaa é qualquer aminoácido que ocorre naturalmente para além de  
Leu ou Ala ou Ile ou Val ou Met

<400> 60

```
Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10
```

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitopo imunogénico restrito a HLA-B\*0702

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (3)..(3)

<223> Xaa é Arg ou Lys ou His ou Met

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (4)..(7)

<223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre  
naturalmente

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (8)..(10)

<223> Xaa são independentemente qualquer aminoácido que ocorre  
naturalmente ou nenhum

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (11)..(11)

<223> Xaa é Leu ou Ala ou Ile ou Val ou Met

<400> 61

```
Ala Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10
```

Lisboa, 25 de junho de 2014

**REIVINDICAÇÕES**

1. Epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702, que é um péptido selecionado no grupo consistindo em APRSPLAPS (SEQ ID NO: 2), SPKANKEIL (SEQ ID NO: 3), GPKHSDCLA (SEQ ID NO: 4).

2. Epitopo imunogénico restrito a HLA-B\*0702, que é um péptido otimizado derivado de um péptido críptico de acordo com a reivindicação 1, em que o referido epitopo imunogénico é selecionado no grupo consistindo em APRSPLAPL (SEQ ID NO:6), APKANKEIL (SEQ ID NO:7), APKHSDCLA (SEQ ID NO:8).

3. Polipéptido quimérico, compreendendo dois, três ou mais epitopos crípticos restritos a HLA-B\*0702 selecionados no grupo consistindo em APRSPLAPS (SEQ ID NO: 2), SPKANKEIL (SEQ ID NO: 3), GPKHSDCLA (SEQ ID NO: 4), DPRRLVQLL (SEQ ID NO: 1).

4. Polipéptido quimérico, compreendendo dois, três ou mais epitopos imunogénicos restritos a HLA-B\*0702 selecionados no grupo consistindo em APRSPLAPL (SEQ ID NO:6), APKANKEIL (SEQ ID NO:7), APKHSDCLA (SEQ ID NO:8) e APRRLVQLL (SEQ ID NO:5).

5. Molécula de ácido nucleico isolado concebida para provocar a expressão de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 de acordo com a reivindicação 1, um epitopo

imunogénico de acordo com a reivindicação 2, ou um polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 3 ou reivindicação 4.

6. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos, como um princípio ativo, um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 de acordo com a reivindicação 1, ou um epitopo polipéptido imunogénico de acordo com a reivindicação 2, ou a um polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 3 ou reivindicação 4, ou um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5.

7. Composição farmacêutica da reivindicação 5, que é uma vacina.

8. Kit de partes compreendendo, em formulações separadas, um primeiro péptido possuindo a sequência de um epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702, e um segundo péptido correspondente ao seu epitopo imunogénico relacionado restrito a HLA-B\*0702, em que o referido primeiro péptido é um epitopo críptico de acordo com a reivindicação 1, e um referido segundo péptido é um péptido imunogénico de acordo com a reivindicação 2.

9. Kit de partes compreendendo, em formulações separadas, um primeiro polipéptido quimérico compreendendo dois, três ou mais epitopos crípticos restritos a HLAB\*0702, e um segundo polipéptido quimérico compreendendo um epitopo imunogénico restrito a HLA-B\*0702 relacionado com o epitopo críptico restrito aos HLA-B\*0702 compreendido no

primeiro polipéptido quimérico, em que o referido primeiro polipéptido quimérico é um polipéptido quimérico de acordo com reivindicação 3, e o referido segundo polipéptido quimérico é um polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 4.

10. Kit de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 9, que é um kit de vacinação, em que o referido primeiro e segundo péptidos ou polipéptidos quiméricos estão em doses de vacinação separadas.

11. Kit de vacinação de acordo com a reivindicação 10, que compreende 2 ou 3 doses do segundo péptido ou polipéptido quimérico, e 3, 4, 5, 6 ou até 50 doses do primeiro péptido ou polipéptido quimérico.

12. Vacina de acordo com a reivindicação 7, ou o kit de vacinação de acordo com reivindicação 10 ou reivindicação 11, em que cada dose compreende 1 a 5 mg de péptido ou 1 a 20 mg de polipéptido quimérico.

13. Vacina de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 12, ou o kit de vacinação de qualquer das reivindicações 9 a 11 em que as doses de vacinação são formuladas para injeção subcutânea.

14. Epitopo críptico restrito a HLA-B\*0702 de acordo com a reivindicação 1, ou um epitopo imunogénico polipéptido de acordo com a reivindicação 2, ou um polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 3 ou

reivindicação 4, ou um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5, para utilização em imunoterapia anticâncer preventiva ou curativa.

15. Péptido de acordo com a reivindicação 1, para utilização na manutenção da resposta imunitária de CTL iniciada pelo seu péptido otimizado relacionado, ou por um polipéptido contendo o mesmo.

16. Polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 3, para utilização na manutenção da resposta imunitária de CTL iniciada pelo seu polipéptido quimérico otimizado relacionado, ou pelo péptido otimizado relacionado com o referido epítipo críptico.

17. Péptido imunogénico de acordo com a reivindicação 2, para utilização na iniciação de uma resposta imunitária de CTL contra o seu epítipo críptico relacionado restrito a HLA-B\*0702.

18. Polipéptido quimérico de acordo com a reivindicação 4, para utilização na iniciação de uma resposta imunitária de CTL contra o epítipo críptico restrito a HLA-B\*0702 relacionado com os epítipos presentes no referido polipéptido quimérico.

Lisboa, 25 de junho de 2014

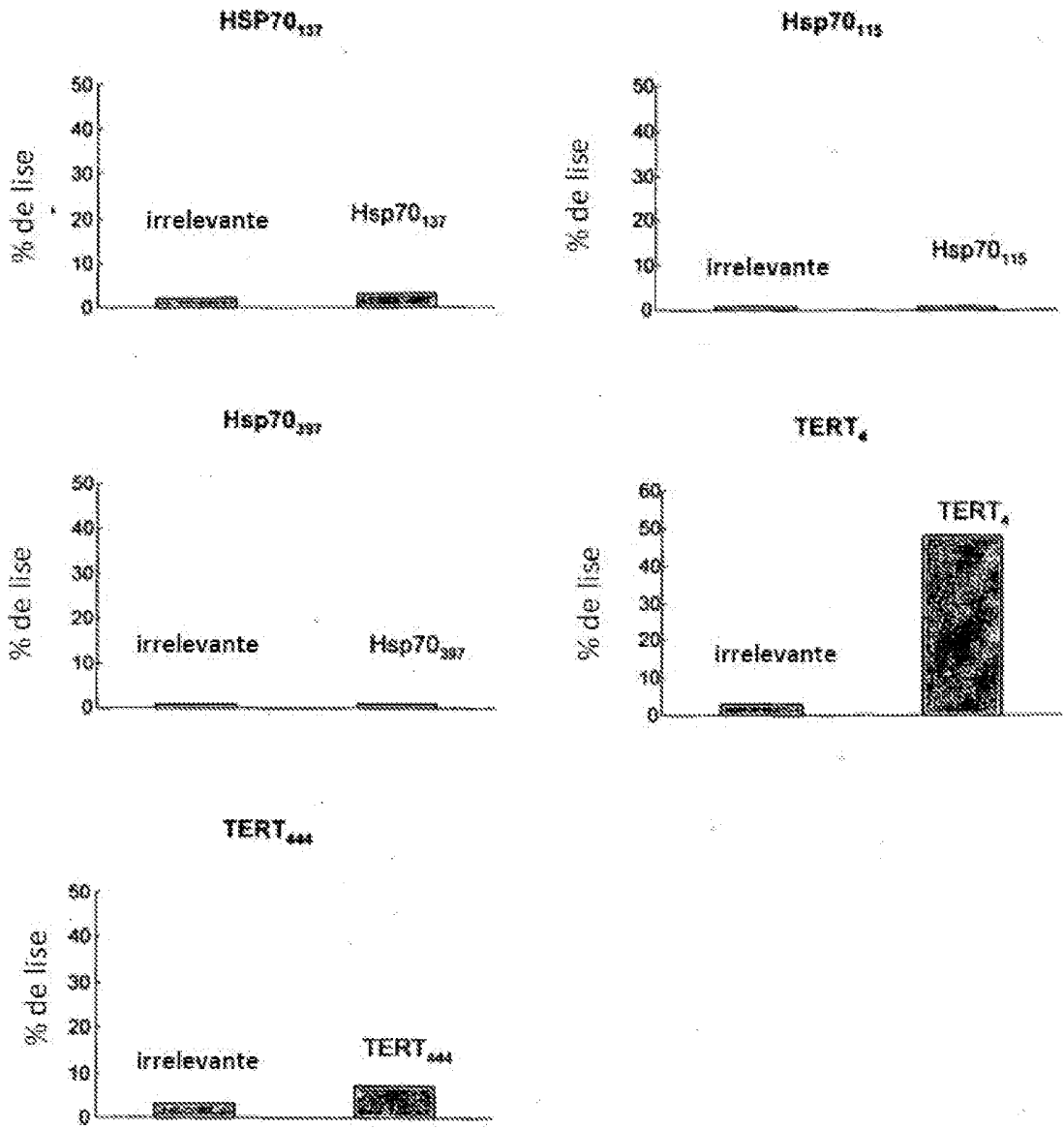


Figura 1

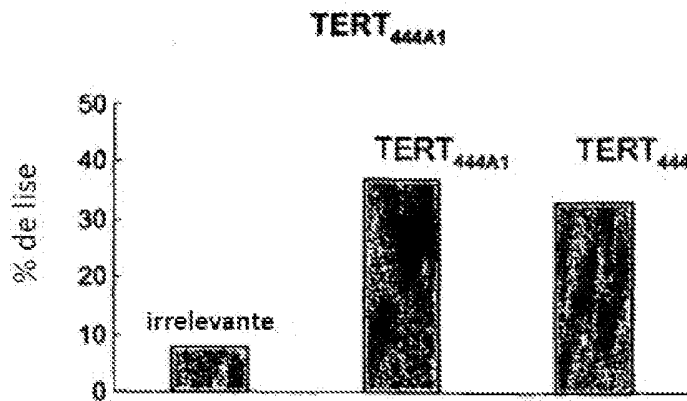
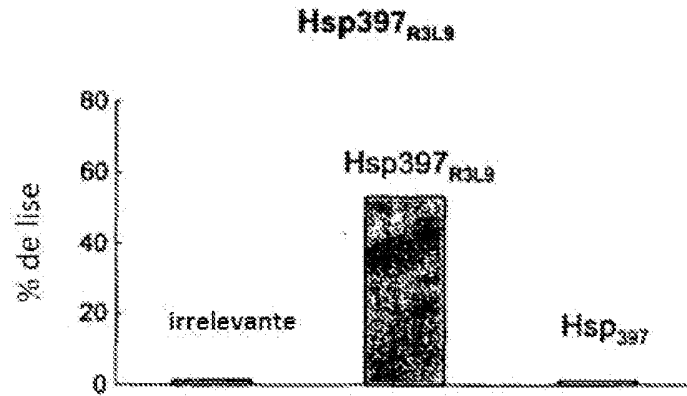
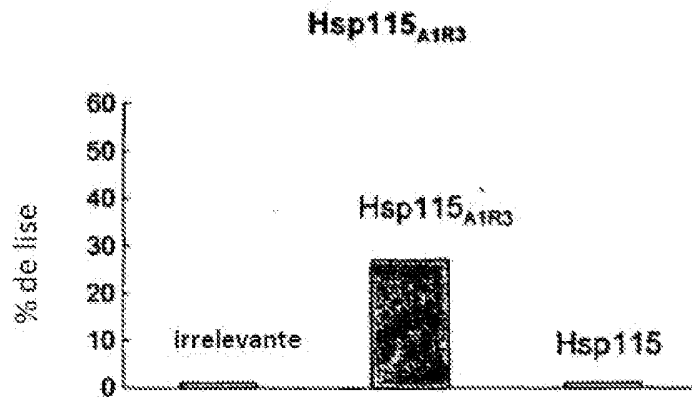


Figura 2

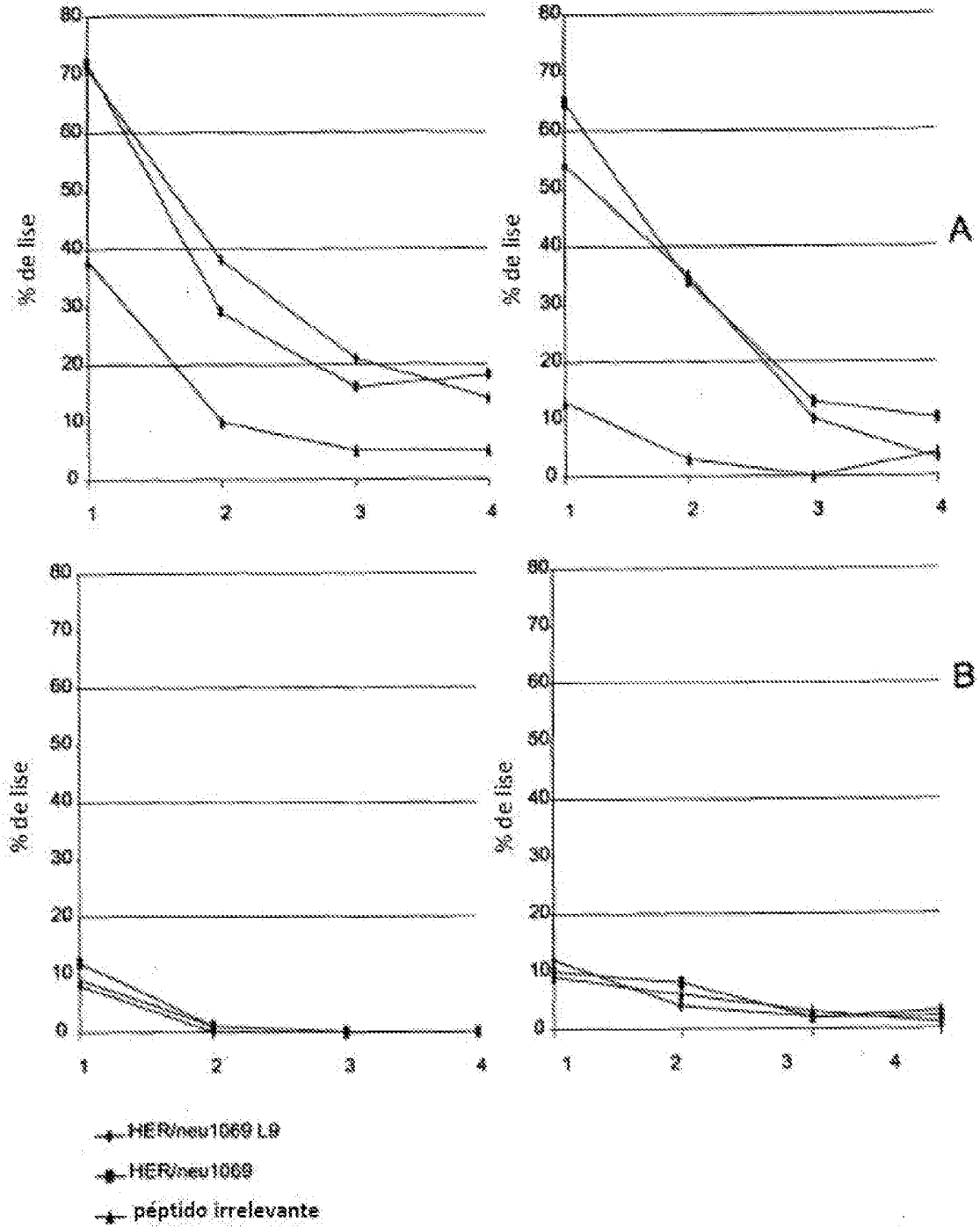


Figura 3

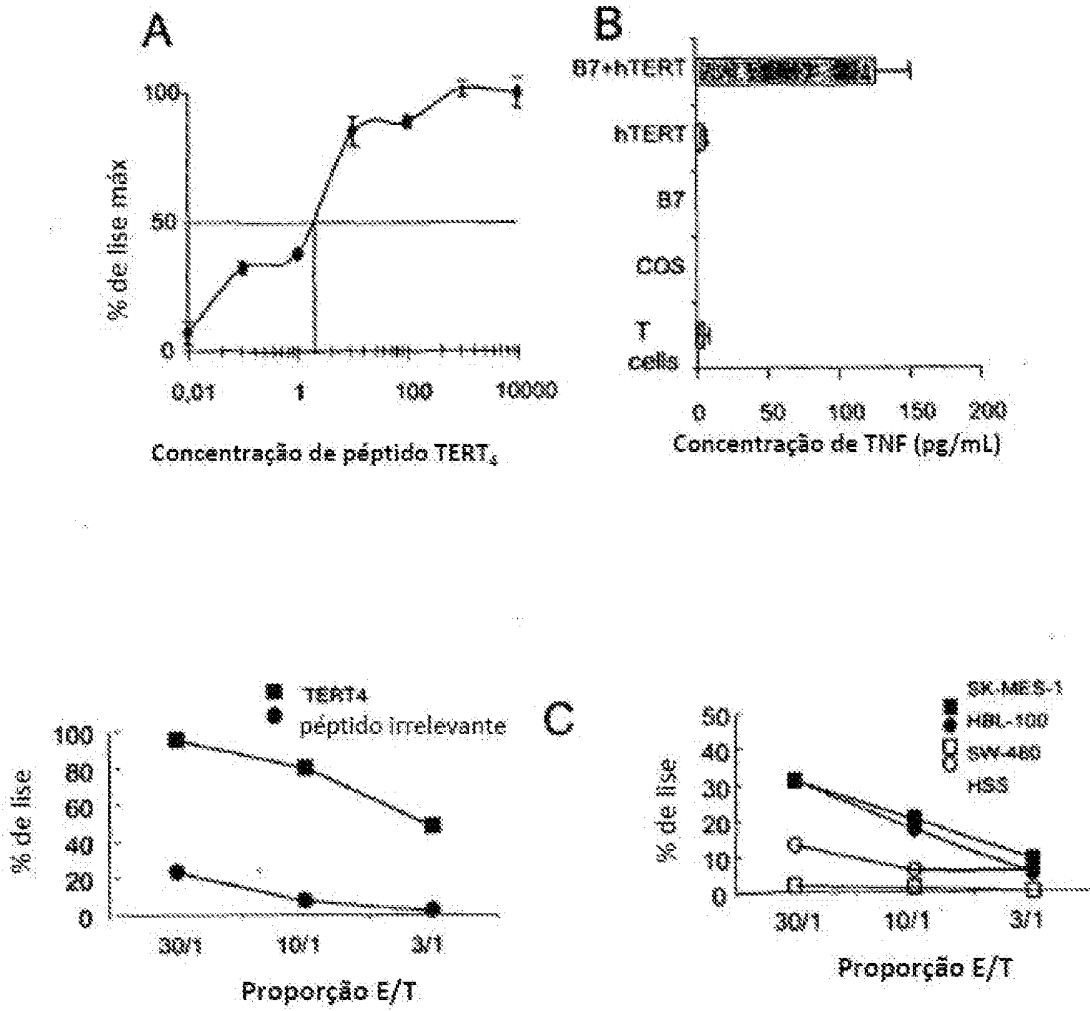
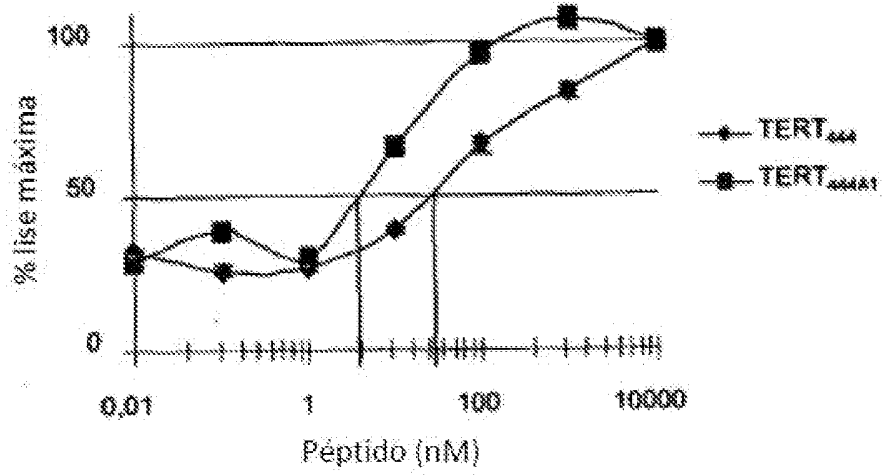


Figura 4

A



B

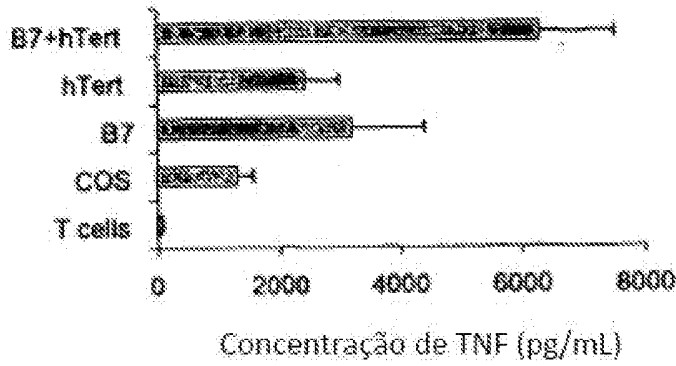


Figura 5

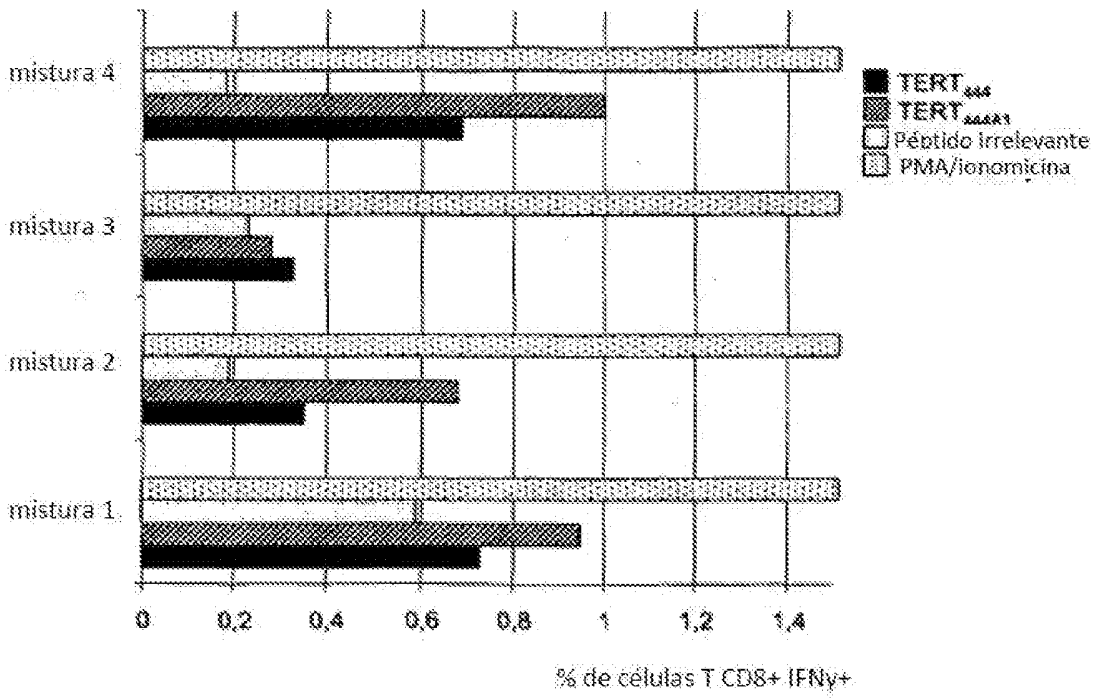


Figura 6

## 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

- \* EP 2006005325 W
- \* WO IB2006002937 W

### Literatura que não é de patentes citadas na Descrição

- \* ANDERTON, S. M. ; VINER, N. J. ; MATHARU, P. ; LOWREY, P. A. ; WRAITH, D. C. Influence of a dominant cryptic epitope on autoimmune T cell tolerance. *Nat Immunol*, 2002, vol. 3, 175-181
- \* BAKKER, A. B. ; VAN DER BURG, S. H. ; HUIJBENS, R. J. ; DRIJFHOUT, J. W. ; MELIEF, C. J. ; ADEMA, G. J. ; FIGDOR, C. G. Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild-type epitope. *Int J Cancer*, 1997, vol. 70, 302-309
- \* BOISGÉRAULT, F. ; ANOSOVA, N. G. ; TAM, R. C. ; ILLIGENS, B. M. ; FEDOSEYEVA, E. V. ; BENICHOU, G. Induction of T-cell response to cryptic MHC determinants during allograft rejection. *Hum Immunol*, 2000, vol. 61, 1352-1362
- \* BOWNE, W. B. ; SRINIVASAN, R. ; WOLCHOK, J. D. ; HAWKINS, W. G. ; BLACHERE, N. E. ; DYALL, R. ; LEWIS, J. J. ; HOUGHTON, A. N. Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. *J Exp Med*, 1999, vol. 190, 1717-1722
- \* CIBOTTI, R. ; KANELLOPOULOS, J. M. ; CABANILS, J. P. ; HALLE-PANENKO, O. ; KOSMATOPOULOS, K. ; SERCARZ, E. ; KOURILSKY, P. Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, vol. 89, 416-420
- \* COLELLA, T. A. ; BULLOCK, T. N. ; RUSSELL, L. B. ; MULLINS, D. W. ; OVERWIJK, W. W. ; LUCKEY, C. J. ; PIERCE, R. A. ; RESTIFO, N. P. ; ENGELHARD, V. H. Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med*, 2000, vol. 191, 1221-1232
- \* CORTEZ-GONZALEZ, X. ; SIDNEY, J. ; ADOTEVI O. ; SETTE, A. ; MILLARD, F. ; LEMONNIER, F. ; LANGLADE-DEMOYEN, P. ; ZANETTI, M. Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTRT. *Int Immunol*, 2005, vol. 18, 1757-1718
- \* DISIS, M. L. ; GOOLEY, T. A. ; RINN, K. ; DAVIS, D. ; PIEPKOM, M. ; CHEEVER, M. A. ; KNUTSON, K. L. ; SCHIFFMAN, K. Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol*, 2002, vol. 20, 2624-2632
- \* DYALL, R. ; BOWNE, W. B. ; WEBER, L. W. ; LEMAULT, J. ; SZABO, P. ; MOROI, Y. ; PISKUN, G. ; LEWIS, J. J. ; HOUGHTON, A. N. ; NIKOLIC-ZUGIC, J. Heteroclitic immunization induces tumor immunity. *J Exp Med*, 1998, vol. 188, 1553-1561
- \* ENGELHOM, M. E. ; GUEVARA-PATINO, J. A. ; NOFFZ, G. ; HOOPER, A. T. ; LOU, O. ; GOLD, J. S. ; KAPPEL, B. J. ; HOUGHTON, A. N. Autoimmunity and tumor immunity induced by immune responses to mutations in self. *Nat Med*, 2006, vol. 12, 198-206
- \* ESPEVIK, T. ; NISSEN-MEYER, J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods*, 1986, vol. 95, 99-105
- \* FRIEDMAN, R. S. ; SPIES, A. G. ; KALOS, M. Identification of naturally processed CD8 T cell epitopes from prostein, a prostate tissue-specific vaccine candidate. *Eur J Immunol*, 2004, vol. 34, 1091-1101
- \* GAUGLER, B. ; BROUWENSTIJN, N. ; VANTOMME, V. ; SZIKORA, J. P. ; VAN DER SPEK, C. W. ; PATARD, J. J. ; BOON, T. ; SCHRIER, P. ; VAN DEN EYNDE, B. J. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, 1996, vol. 44, 323-30
- \* GROSS, D. A. ; GRAFF-DUBOIS, S. ; OPOLON, P. ; COMET, S. ; ALVES, P. ; BENNACEUR-GRISCELLI, A. ; FAURE, O. ; GUILLAUME, P. ; FIRAT, H. ; CHOUAIB, S. et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 2004, vol. 113, 425-433
- \* GROSSMANN, M. E. ; DAVILA, E. ; CELIS, E. Avoiding Tolerance Against Prostatic Antigens With Subdominant Peptide Epitopes. *J Immunother*, 2001, vol. 24, 237-241

- HAWKINS, W. G. ; GOLD, J. S. ; DYALL, R. ; WOLCHOK, J. D. ; HOOS, A. ; BOWNE, W. B. ; SRINIVASAN, R. ; HOUGHTON, A. N. ; LEWIS, J. J. Immunization with DNA coding for gp100 results in CD4 T-cell independent antitumor immunity. *Surgery*, 2000, vol. 128, 273-280
- HERNANDEZ, J. ; LEE, P. P. ; DAVIS, M. M. ; SHERMAN, L. A. The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J Immunol*, 2000, vol. 164, 586-602
- LALLY, K. M. ; MOCELLIN, S. ; OHNMACHT, G. A. ; NIELSEN, M. B. ; BETTINOTTI, M. ; PANELLI, M. C. ; MONSURRO, V. ; MARINCOLA, F. M. Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading. *Int J Cancer*, 2001, vol. 93, 841-847
- LENNERZ V. ; FATHO M. ; GENTILINI C. ; FRYE R. A. ; LIFKE A. ; FEREL D. ; WÖLFEL C. ; HUBER C. ; WÖLFEL T. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *PNAS U.S.A.*, 2005, vol. 102, 18013-8
- LU, J. ; CELIS, E. Use of two predictive algorithms of the world wide web for the identification of tumor-reactive T-cell epitopes. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 5223-5227
- LUITEN, R. ; VAN DER BRUGGEN, P. A MAGE-A1 peptide is recognized on HLA-B7 human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue antigens*, 2000, vol. 55, 149-152
- MEYERSON, M. ; COUNTER, C. M. ; EATON, E. N. ; ELLISEN, L. W. ; STEINER, P. ; CADDLE, S. D. ; ZIAUGRA, L. ; BEJERSBERGEN, R. L. ; DAVIDOFF, M. J. ; LIU, Q. et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997, vol. 90, 785-795
- MOUDGIL, K. D. ; SERCARZ, E. E. Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself?. *Immunol Today*, 1994, vol. 15, 353-355
- MOUDGIL, K. D. ; SERCARZ, E. E. The T cell repertoire against cryptic self determinants and its involvement in autoimmunity and cancer. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994, vol. 73, 283-289
- MOUDGIL, K. D. ; SOUTHWOOD, S. ; AMETANI, A. ; KIM, K. ; SETTE, A. ; SERCARZ, E. E. The self-directed T cell repertoire against mouse lysozyme reflects the influence of the hierarchy of its own determinants and can be engaged by a foreign lysozyme. *J Immunol*, 1999, vol. 163, 4232-4237
- NAFTZGER, C. ; TAKECHI, Y. ; KOHDA, H. ; HARA, I. ; VIJAYASARADHI, S. ; HOUGHTON, A. N. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, vol. 93, 14809-14814
- OVERWIJK, W. W. ; THEORET, M. R. ; FINKELSTEIN, S. E. ; SURMAN, D. R. ; DE JONG, L. A. ; VYTH-DREESE, F. A. ; DELLEMIJN, T. A. ; ANTONY, P. A. ; SPIESS, P. J. ; PALMER, D. C. et al. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med*, 2003, vol. 198, 569-580
- OVERWIJK, W. W. ; TSUNG, A. ; IRVINE, K. R. ; PARKHURST, M. R. ; GOLETZ, T. J. ; TSUNG, K. ; CARROLL, M. W. ; LIU, C. ; MOSS, B. ; ROSENBERG, S. A. gp100/gmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med*, 1998, vol. 188, 277-286
- PALOMBA, M. L. ; ROBERTS, W. K. ; DAO, T. ; MANUKIAN, G. ; GUEVARA-PATINO, J. A. ; WOLCHOK, J. D. ; SCHEINBERG, D. A. ; HOUGHTON, A. N. CD8+ T-cell-dependent immunity following xenogeneic DNA immunization against CD20 in a tumor challenge model of B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2005, vol. 11, 370-379
- PARKER, K.C. ; BEDNAREK, M.A. ; COLIGAN J.E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol*, 1994, vol. 152, 163-175
- PARKHURST, M. R. ; SALGALLER, M. L. ; SOUTHWOOD, S. ; ROBBINS, P. F. ; SETTE, A. ; ROSENBERG, S. A. ; KAWAKAMI, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. *J Immunol*, 1996, vol. 157, 2538-2548
- PATERSON, Y. ; MACIAG, P. C. Listeria-based vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther*, 2005, vol. 7, 454-460
- RAMMENSEE, H. ; BACHMANN, J. ; EMMERICH, N. P. ; BACHOR, O.A. ; STEVANOVIC, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 1999, vol. 50, 213-219
- 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

- RONSIN, C.; CHUNG-SCOTT, V.; POUILLON, I.; AKNOUCHE, N.; GAUDIN, C.; TRIEBEL, F. A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *J Immunol*, 1999, vol. 163, 483-90
- SAROBE, P.; PENDLETON, C. D.; AKATSUKA, T.; LAU, D.; ENGELHARD, V. H.; FEINSTONE, S. M.; BERZOFKY, J. A. Enhanced in vitro potency and in vivo immunogenicity of a CTL epitope from hepatitis C virus core protein following amino acid replacement at secondary HLA-A2.1 binding positions. *J Clin Invest*, 1998, vol. 102, 1239-1248
- SCARDINO, A.; GROSS, D. A.; ALVES, P.; SCHULTZE, J. L.; GRAFF-DUBOIS, S.; FAURE, O.; TOURDOT, S.; CHOUAIB, S.; NADLER, L. M.; LEMONNIER, F. A. et al. HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*, 2002, vol. 168, 5900-5906
- SIDNEY, J.; SOUTHWOOD, S.; DEL GUERCIO, M. F.; GREY, H. M.; CHESNUT, R. W.; KUBO, R. T.; SETTE, A. Specificity and degeneracy in peptide binding to HLA-B7-like class I molecules. *J Immunol*, 1998, vol. 157, 3480-3490
- SINHA, P.; CHI, H. H.; KIM, H. R.; CLAUSEN, B. E.; PEDERSON, B.; SERCARZ, E. E.; FORSTER, I.; MOUDGIL, K. D. Mouse lysozyme-M knockout mice reveal how the self-determinant hierarchy shapes the T cell repertoire against this circulating self antigen in wild-type mice. *J Immunol*, 2004, vol. 173, 1763-1771
- SLAGER, E.H.; VAN DER MINNE, C.E.; GOUDSMIT, J.; VAN OERS J., M.; KOSTENSE, S.; HAVENGA, M.J.; OSANTA, S.; GRIFFIOEN, M. Induction of CAMELNY-ESO-ORF2-specific CD8+ T cells upon stimulation with dendritic cells infected with a modified Ad5 vector expressing a chimeric Ad5/35 fiber. *Cancer Gene Ther*, 2004, vol. 11, 227-238
- THEOBALD, M.; BIGGS, J.; HERNANDEZ, J.; LUSTGARTEN, J.; LABADIE, C.; SHERMAN, L. A. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1997, vol. 185, 833-841
- 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
- VALMORI, D.; FONTENEAU, J. F.; LIZANA, C. M.; GERVOIS, N.; LIENARD, D.; RIMOLDI, D.; JONGENEEL, V.; JOTEREAU, F.; CEROTTINI, J. C.; ROMERO, P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol*, 1998, vol. 160, 1750-1758
- VAN DEN EYNDE, B. J.; GAUGLER, B.; PROBST-KEPPER, M.; MICHAUX, L.; DEVUYST, O.; LORGE, F.; WEYNANTS, P.; BOON, T. A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med*, 1999, vol. 190, 1793-1800
- VIERBOOM, M. P.; NIJMAN, H. W.; OFFRINGA, R.; VAN DER VOORT, E. I.; VAN HALL, T.; VAN DEN BROEK, L.; FLEUREN, G. J.; KENEMANS, P.; KAST, W. M.; MELIEF, C. J. Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1997, vol. 188, 695-704
- WEBER, L. W.; BOWNE, W. B.; WOLCHOK, J. D.; SRINIVASAN, R.; QIN, J.; MOROI, Y.; CLYNES, R.; SONG, P.; LEWIS, J. J.; HOUGHTON, A. N. Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J Clin Invest*, 1998, vol. 102, 1258-1264
- WORLEY, B.S.; VAN DEN BROEKE, L.T.; GOLETZ, T.J.; PENDLETON C.D.; DASCHBACH, E.M.; THOMAS E.K.; MARINCOLA, F.M.; HELMAN L.J.; BERZOFKY, J.A. Antigenicity of fusion proteins from sarcoma-associated chromosomal translocations. *Cancer Res*, 2001, vol. 61, 6868-6875