

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0713978-0 A2**

(22) Data de Depósito: 26/06/2007
(43) Data da Publicação: 27/11/2012
(RPI 2186)



(51) *Int.Cl.:*

A61K 39/04

A61K 39/02

A61K 39/12

A61K 39/002

(54) **Título:** EXPANSÃO DO REPERTÓRIO DE CÉLULAS T PARA INCLUIR EPÍTOPOS SUBDOMINANTES ATRAVÉS DA VACINAÇÃO COM ANTÍGENEOS LIBERADOS COMO FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS OU COQUETÊIS DE PEPTÍDEO

(30) **Prioridade Unionista:** 28/06/2006 DK PA200600861

(73) **Titular(es):** Statens Serum Institut

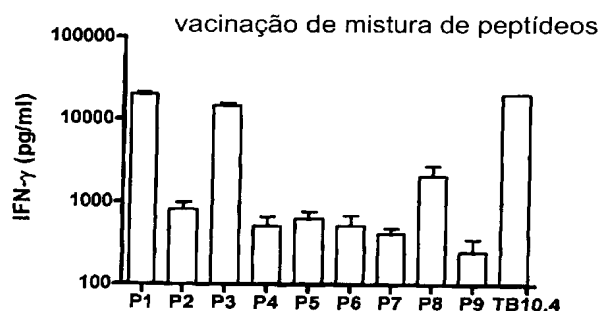
(72) **Inventor(es):** Claus Aagaard Pedersen, Jes Dietrich, Peter Andersen

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT DK2007000312 de 26/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/000261 de 03/01/2008

(57) **Resumo:** EXPANSÃO DE REPERTÓRIO DE CÉLULAS T PARA INCLUIR EPÍTOPOS SUBDOMINANTES ATRAVÉS DA VACINAÇÃO COM ANTÍGENEOS LIBERADOS COMO FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS OU COQUETÊIS DE PEPTÍDEO. A presente invenção refere-se a uma forma conveniente de induzir um reconhecimento amplo de respostas dominantes e subdominantes para epítopos de qualquer antígeno importante para profilaxia ou tratamento de uma doença crônica, através da imunização com conjuntos de fragmentos sobrepostos (peptídeos sintéticos, por exemplo 10 a 30 mers com 2 a 20 aa sobrepostos) do antígeno desejado em adjuvantes apropriados. O repertório de células T é preparado para incluir não apenas o epítipo imunodominante reconhecido quando a molécula intacta é usada para imunização e induzida pela própria infecção crônica, mas para induzir uma resposta muito mais ampla e balanceada para vários epítopos subdominantes. A resposta de células T resultante para epítopos subdominantes é importante para proteção contra doenças crônicas que por si só induzem a resposta focada apenas para epítopos imunodominantes. A grande vantagem da presente invenção é que ela não requer conhecimento prévio sobre a localização e identidade precisas dos epítopos subdominantes e seu reconhecimento em uma população humana, mas expande o repertório de células T, e através dele o número total de epítopos reconhecidos pelas células T específicas preparadas através da vacinação a partir de poucos epítopos imunodominantes até muitos epítopos de vacina relevante. Para doenças crônicas controladas por imunidade humoral, a resposta de células de T-helper preparadas pela mistura de peptídeos pode, convenientemente, também ser reforçada por proteínas inteiras para máxima indução da resposta do anticorpo.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"EXPANSÃO DO REPERTÓRIO DE CÉLULAS T PARA INCLUIR EPÍTOPOS SUBDOMINANTES ATRAVÉS DA VACINAÇÃO COM ANTÍGENOS LIBERADOS COMO FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS OU COQUETÉIS DE PEPTÍDEO"**.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma vacina contra doenças crônicas tais como uma infecção bacteriana, viral ou parasitária ou câncer compreendendo uma mistura de peptídeos de peptídeos sobrepostos abrangendo a sequência de aminoácidos inteira de uma proteína que é expressa
10 durante a fase crônica das doenças tais como uma infecção crônica causada por uma bactéria, um vírus persistente ou parasita ou de proteínas expressas em tumores malignos, um método de fazer tais vacinas e profilaxia e tratamento da doença crônica.

ANTECEDENTES GERAIS

15 Comparado ao número limitado de doenças onde vacinas estão correntemente disponíveis, um número muito grande tem tentativas liberadas por enquanto para desenvolver vacinas eficientes. Uma característica comum para muitas destas doenças infecciosas, como também câncer, é que elas se desenvolvem lentamente e manifestam como doenças crônicas,
20 onde a doença é mantida durante anos em face a uma resposta imune existente do hospedeiro. Isto com frequência eventualmente resulta em imunopatologia, que são alguns casos tais como *Chlamydia thracomatis* é a causa real da doença humana tal como cicatrização inflamatória do oviduto resultando em infertilidade. Para algumas doenças, tais como infecção de *M. tuberculosis* (TB), uma vacina existe (BCG) mas embora a vacina possa pre-
25 venir as manifestações agudas da doença, a bactéria não está elucidada e uma doença crônica ou latente portanto estabelecida. TB passa essencialmente por 3 fases. Durante a fase aguda, as bactérias proliferam-se nos órgãos, até que a resposta imune aumenta para o ponto no qual pode-se con-
30 trolar a infecção, sob o qual a carga bacteriana aumenta e começa a diminuir. Após isso, uma fase crônica ou latente é estabelecida onde a carga bacteriana é mantida estável em um nível baixo. Nesta fase *M. tuberculosis* vai a

partir de multiplicação ativa até um estado de persistência lento ou não-replicativo que pode durar por muitos anos. Porém, em alguns casos de TB, a infecção pode reativar de repente e doença evidente será o resultado. Os fatores que levam a esta reativação são grandemente desconhecidos. Em outros casos tais como Chlamydia, a infecção pode permanecer assintomática mas o processo inflamatório contínuo causa manifestações clínicas posteriores tais como infertilidade.

A resposta imune para muitas destas doenças difíceis incluem um componente de resposta humoral ou imune mediada por célula (CMI). A resposta CMI é direcionada a uma hierarquia de antígenos de células T e epítomos do patógeno. Os epítomos são extensões de aminoácidos (aa) de 7-9 aa (MHC I) e 12-15 aa (MHC II) (1). Em doença viral e bacteriana crônica tal como HIV, TB como também em câncer, a hierarquia das respostas de epítomo alteram com o passar do tempo para alguns epítomos imunodominantes que gradualmente constituem uma parte grande da resposta total de células T, enquanto que um número grande de outros epítomos tendo o potencial para ligar às moléculas de apresentação de antígeno de MHC classe I ou II são subdominantes ou até mesmo oculto resultando em respostas de células T em níveis próximos ou abaixo do nível de detecção (2-6). Se induzidas através de vacinação (sem a competição de epítomos dominantes), as respostas para tais epítomos subdominantes foram relatadas ser protetoras, por exemplo em TB (7), indicando que os epítomos são expressados de fato durante a infecção natural e podem ser reconhecidos pelas células efetoras no patógeno invasor. Que tais respostas possam ter vantagens comparadas às respostas para epítomos imunodominantes foi sugerido por estudos em HIV onde os mutantes liberados desprovidos de epítomos imunodominantes, e portanto não vistos pelo sistema imune, são uma preocupação principal para desenvolvimento de vacina atual (8).

A utilização de epítomos de células T subdominantes no projeto de vacinas têm até então sido impedida por dois obstáculos principais; i) A necessidade de um painel grande de epítomos diferentes para abranger uma população humana diversa devido à variação de epítomos individuais reco-

nhecidos por indivíduos com composição de HLA diferente; ii) A necessidade de identificar epítomos subdominantes aos quais apenas respostas de células T de nível baixo próximo ou abaixo do nível de detecção dos ensaios imunológicos (eg ELISPOT) são encontradas.

5 Olsen et al. (7) descreveu que uma vacina com base em um epítomo subdominante de ESAT6 pode proteger contra TB. Porém, uma mistura de peptídeos sobrepostos abrangendo a região inteira de ESAT6 não foi usada neste estudo.

10 Em WO01016163 é descrita uma vacina contra vírus compreendendo uma mistura de peptídeos que consiste em peptídeos que ativam as células T independente de seu genótipo de HLA. Este pedido de patente ensina o uso de misturas de peptídeo de Hepatite B para permitir uma cobertura ampla quando aplicadas para a vacinação de uma população humana geneticamente diversa assim evitando não-respondedores encontrados ao
15 imunizar com peptídeos únicos. Esta invenção não ensina a expansão dirigida por peptídeo de células T direcionadas contra epítomos subdominantes de células T relevantes para a vacinação preventiva e terapêutica contra doenças crônicas como ensinado na presente invenção.

Em WO03011331 é descrita uma vacina de reforço principal.
20 Para prevenir uma resposta aumentada a epítomos dominantes e resposta diminuída a epítomos subdominantes, preparação é alcançada por um DNA ou vetor viral que codifica uma cadeia de epítomos. Seguindo o estágio preparatório, os epítomos são individualmente usados, em construções separadas ou carregados em veículos separados, para reforçar a resposta ao invés
25 de ser administrados como um DNA de poliepítomo simples ou construção viral. Em contraste, a presente invenção usa extensões de sequências de aminoácidos, abrangendo uma proteína inteira, em uma mistura de peptídeos com de 6-20 aminoácidos sobrepostos para preparar e opcionalmente reforçar com a proteína inteira como uma vacina de subunidade auxiliar ou
30 expressa em sistemas de liberação viral para indução máxima das respostas humorais também.

É em geral observado que em doenças crônicas a hierarquia das

respostas dos epítomos altera com o passar do tempo para constituir respostas voltadas apenas para alguns epítomos dominantes. Porém, como as respostas contra epítomos subdominantes tem provado protetoras (7) e uma vez que uma resposta contra estes epítomos não é promovida pela própria doença crônica, uma doença crônica representa um alvo óbvio para uma invenção que induza uma resposta imune para uma faixa ampla de epítomos, incluindo epítomos tanto dominantes como, essencialmente, subdominantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve vacinas que induzem um reconhecimento amplo de respostas dominantes e subdominantes para qualquer antígeno dado. A vacina compreende fragmentos sobrepostos do antígeno desejado em adjuvantes apropriados. O repertório de células T é assim expandido para incluir não apenas o epítomo imunodominante reconhecido quando a molécula intacta é usada para imunização ou induzida pela própria infecção crônica, mas também induzir uma resposta muito mais ampla e balanceada para vários epítomos subdominantes. A grande vantagem da presente invenção é que ela não requer conhecimento prévio sobre a localização ou identidade precisas dos epítomos subdominantes e seu reconhecimento em uma população humana, mas expande o repertório de células T, e através dele o número total de células T específicas alvos preparadas pela vacinação a partir de poucos epítomos imunodominantes até muitos epítomos. Como ensinado pela presente invenção, doenças crônicas alvos com uma faixa ampla de respostas para epítomos subdominantes atrelam a imunidade para estas doenças dramaticamente.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve uma vacina contra uma doença crônica tal como uma infecção bacteriana, viral ou parasitária ou câncer compreendendo uma mistura de peptídeos que consiste em peptídeos sobrepostos adjacentes abrangendo a sequência de aminoácidos inteira de uma proteína que é expressa durante a fase crônica da doença.

A presente invenção descreve o uso de uma mistura de peptídeos sobrepostos derivados de uma proteína antigênica e/ou do ácido nu-

cléico que codifica estes peptídeos para uma vacina contra uma doença crônica tal como uma infecção bacteriana, viral ou parasitária ou câncer.

Os peptídeos são 10 a 30 aminoácidos de comprimento, preferivelmente 12-20 aminoácidos de comprimento onde a sobreposição com o peptídeo adjacente é de 6-20 aminoácidos, preferivelmente de 10-12 aminoácidos.

A proteína antigênica que a mistura de peptídeos abrange é escolhida dentre proteínas que são expressas durante a fase crônica de uma doença e induz uma resposta imune mediada por célula no caso de doença crônica.

Preferivelmente a proteína é selecionada de uma bactéria tal como uma micobactéria virulenta, por exemplo por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* ou *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* ou *Chlamydia trachomatis*, ou um vírus, tal como o da hepatite B ou C, ou um parasita, tal como *Leishmania*, ou o parasita causador de malária *Plasmodium falciparum* ou a partir de moléculas expressas em tumores malignos.

Os peptídeos não são restritos mas preferivelmente a partir de uma proteína selecionada de *M. Tuberculosis*, tal como ESAT6, Ag85A, Ag85B ou TB10.4, ou a partir de *Chlamydia trachomatis*, tal como CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 ou CT681, ou a partir de um vírus da hepatite B ou C ou a partir de *Plasmodium falciparum*, tal como Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 ou CSP.

A invenção também descreve um método para preparar uma mistura de peptídeos de acordo com a invenção por clivagem proteolítica da proteína com dois ou mais agentes de clivagem proteolíticos tais como enzimas proteolíticas como tripsina, protease V-8, AspN ou quimotripsina ou agentes químicos tais como CNBr ou BNPS-skatole.

A mistura de peptídeos de acordo com a invenção pode ser usada para preparar uma vacina contra uma doença crônica tal como uma infecção bacteriana, viral ou parasitária ou câncer. A vacina pode opcionalmente compreender um sistema de liberação tal como um adjuvante. O ad-

juvante é preferivelmente à base de lipossomas catiônicos tal como brometo de dimetildiocetadecilamônio / dibeenato de trealose (DDA/TDB). A mistura de peptídeos usada para vacinação pode ser misturada com lipossomas pré-formados ou cada peptídeo pode ser misturado com os lipossomas pré-formados, os peptídeos individuais formulados nos lipossomas são depois misturados antes da imunização

Cada peptídeo na mistura de peptídeos pode preferivelmente ser misturado individualmente com o lipossoma antes de fazer a mistura de peptídeos para ótima interação com antígeno individual apresentando células do sistema imune assim assegurando respostas máximas para todos os possíveis epítomos na molécula.

A invenção também descreve um método e vacina para profilaxia ou tratamento terapêutico de uma doença crônica em um animal, incluindo um ser humano, compreendendo administrar ao animal a vacina da invenção. Opcionalmente a profilaxia ou tratamento é reforçado administrando uma segunda vacina compreendendo a proteína inteira abrangida pela mistura de peptídeos em um adjuvante ou expressa em uns sistemas de liberação viral ou como uma vacina de DNA pura para reforço ótimo de um CMI como também uma resposta humoral.

A invenção também descreve uma vacina em que a sequência de aminoácidos é lipídada ou conjugada diretamente com agonista de TLR tal como CPG a fim de permitir um efeito autoauxiliar do polipeptídeo.

A modalidade preferida da invenção é uma vacina compreendendo uma mistura de peptídeos da invenção com um adjuvante como descrito acima.

DEFINIÇÕES

DOENÇA CRÔNICA

Uma doença crônica é uma doença duradoura ou recorrente. O termo *crônica* descreve o curso da doença, ou sua taxa de princípio e desenvolvimento. Um curso crônico é distinguido de um curso recorrente; doenças recorrentes reincidentem repetidamente, com períodos de remissão no meio. Infecções crônicas podem ser causadas por bactérias, por exemplo

Mycobacteria sp. ou Chlamydia s.p entre outras, por vírus, por exemplo o da Hepatite ou HIV, por um parasita, por exemplo um parasita causador da malária ou Leishmania, ou por doenças tais como câncer, diabetes etc.

PEPTÍDEOS

5 A palavra "peptídeo" na presente invenção deveria ter seu significado usual. Ou seja, uma cadeia de aminoácido de qualquer comprimento sendo uma parte ou fragmento de uma proteína, em que os resíduos de aminoácido são ligados através de ligações peptídicas covalentes.

10 O peptídeo pode ser modificado quimicamente sendo glicosilado, sendo lipidado (por exemplo por lipidação química com succinimida de palmitoilóxi como descrito por (9), marcação com PAM3Cys (18) ou com cloreto de dodecanoíla como descrito por (10)), compreendendo grupos protetivos, ou contendo aminoácidos adicionais tais como por exemplo um marcador His ou um peptídeo sinal ou por conjugação direta com agonista de TLR
15 (por exemplo, como descrito por (11)).

Cada peptídeo pode desse modo ser caracterizado através de aminoácidos de específicos e ser codificado por sequências de ácido nucléico específicas. Será entendido que tais sequências incluem análogos e variantes produzidos através de métodos recombinantes ou sintéticos em que
20 tais sequências de polipeptídeo foram modificadas mediante substituição, inserção, adição ou deleção de um ou mais resíduos de aminoácido no polipeptídeo recombinante e ainda são imunogênicos em quaisquer dos ensaios biológicos descritos aqui. Substituições são preferivelmente "conservadoras". Estas são definidas de acordo com a tabela a seguir. Aminoácidos no
25 mesmo bloco na segunda coluna e preferivelmente na mesma linha na terceira coluna podem ser substituídos uns pelos outros. Os aminoácidos na terceira coluna são indicados em código de uma carta.

ALIFÁTICO	Não-polar	GAP
		ILV
	Polar-não carregado	CSTM
		NQ
	Polar-carregado	DE
		KR
AROMÁTICO		HFWY

Uma mistura de peptídeos é mistura líquida de fragmentos de uma proteína.

Uma mistura de peptídeos preferida dentro da presente invenção é com base em uma proteína de *M. tuberculosis* tal como ESAT6, Ag85A, Ag85B ou TB10.4 ou de *Chlamydia trachomatis* tal como CT184, CT521, CT443, CT520, CT521 ou CT375 ou de um vírus de hepatite ou de *Plasmodium falciparum* tal como momp, omp, msp1, msp3, ama1 ou glurp. Ela pode também ser uma mistura de peptídeos ou digesto proteolítico com base em uma molécula de fusão por exemplo como previamente descrito como umas construções de vacina relevantes contra TB em PCT/DK2006/000356. Em geral todas as misturas peptídicas de proteínas induzindo uma resposta de CMI que podem ser usadas em vacinas contra doença crônica podem ser usadas para induzir uma resposta profiláctica ou terapêutica aumentada como uma vacina.

Ao longo deste relatório descritivo, a menos que o contexto do contrário requeira, a palavra "compreendem", ou variações da mesma tais como "compreende" ou "compreendendo", será entendida implicar a inclusão de um elemento declarado ou número inteiro ou grupo de elementos ou números inteiros mas não a exclusão de qualquer outro elemento ou número inteiro ou grupo de elementos ou números inteiros.

Embora o comprimento mínimo de um epítipo de células T tenha sido mostrado ser pelo menos 6 aminoácidos, é normal que tais epítipos sejam constituídos de extensões mais longas de aminoácidos. Consequentemente, prefere-se que o fragmento de polipeptídeo da invenção tenha um comprimento de pelo menos 7 resíduos de aminoácido, tais como pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18, pelo menos 20, pelo menos 22, pelo menos 24, e pelo menos 30 resíduos de aminoácido. Consequentemente, em modalidades importantes do método inventivo, prefere-se que o fragmento de polipeptídeo tenha um comprimento de no máximo 50 resíduos de aminoácido, tal como no máximo 40, 35, 30, 25, e 20 resíduos de aminoácido. Espera-se que os peptídeos tendo um comprimento de entre 10 e 20 resíduos de ami-

noácido provem ser muito eficientes como epítomos de MHC classe II e portanto comprimentos especialmente preferidos do fragmento de polipeptídeo usados no método inventivo são 18, tais como 15, 14, 13, 12 e até mesmo 11 resíduos de aminoácido. Espera-se que os peptídeos tendo um comprimento de entre 7 e 12 resíduos de aminoácido provem ser muito eficientes como epítomos de MHC classe I e portanto comprimentos especialmente preferidos do fragmento de polipeptídeo usados no método inventivo são 11, tais como 10, 9, 8 e até mesmo 7 resíduos de aminoácido.

EPÍTOPOS

Por epítomos de células T é entendido uma sequência de aminoácidos que são reconhecidos pelas células T específicas através de seu receptor de célula T após apresentação por uma célula de apresentação de antígeno no contexto de MHC classe I ou II.

Um epítomo dominante é uma sequência de aminoácidos que, quando parte de uma proteína, induz uma resposta de células T alta e frequentemente a maior parte da resposta para um antígeno é direcionada a poucos epítomos T de células T dominantes.

Um epítomo subdominante é uma sequência de aminoácidos que, quando parte de uma proteína, não induz uma resposta forte de células T, embora os epítomos sejam imunogênicos e capazes de induzir uma resposta de células T significativa quando isolados da proteína.

Por mistura de polipeptídeos ou fragmentos de proteína sobrepostos é entendido uma mistura de 10 a 30 mers, com uma de 6-20 aminoácidos sobrepostos, abrangendo uma proteína inteira.

VARIANTES

Uma característica comum dos polipeptídeos da invenção é sua capacidade de induzir uma resposta imunológica como ilustrado nos exemplos. É entendido que uma variante de um polipeptídeo da invenção produzido através de substituição, inserção, adição ou deleção pode também ser imunogênica como determinado por quaisquer dos ensaios descritos aqui.

INDIVÍDUO IMUNE

Um indivíduo imune é definido como uma pessoa ou um animal

que tem uma infecção esclarecida ou controlada.

RESPOSTA IMUNE

A resposta imune pode ser monitorada por um dos métodos a seguir:

- 5 • Uma resposta celular in vitro é determinada por indução da liberação de uma citocina relevante tal como IFN- γ ou a indução da proliferação em linfócitos retirados de um animal ou ser humano corrente ou previamente infectado com micobactérias virulentas ou imunizado com a mistura de peptídeos relevante. A indução é executada pela adição da mistura de
10 peptídeos ou a porção imunogênica da mistura a uma suspensão compreendendo de 2×10^5 células a 4×10^5 células por poço. As células sendo isoladas do sangue, do baço, dos linfonodos, do fígado ou do pulmão e a adição do polipeptídeo ou a porção imunogênica resultando em uma concentração de não mais que 20 μg por ml de suspensão e a estimulação sendo execu-
15 tadas de dois a cinco dias. Para monitorar a proliferação celular, as células são pulsadas com Timidina radioativamente marcada e após 16-22 horas de incubação detecção da proliferação é medida por contagem de cintilação líquida. Uma resposta positiva é definida como sendo uma resposta mais que de base mais dois desvios-padrões. A liberação de IFN- γ pode ser de-
20 terminada pelo método de ELISA, que é bem conhecido a uma pessoa versada na técnica. Uma resposta positiva sendo uma resposta mais que de base mais dois desvios-padrões. Outras citocinas que IFN- γ poderiam ser relevantes ao monitorar a resposta imunológica para o polipeptídeo, tal como IL-12, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TGF- β . Outro método mais sensível para
25 detectar a resposta imune é o método de ELISpot, em que a frequência das células produtoras IFN- γ é determinada. Em uma placa de ELISpot (MAHA, Millipore) pré-revestida com anticorpos de IFN- γ antimurinos (PharMingen) números graduados de células isoladas de sangue, baço, ou pulmão (tipicamente entre 1 a 4×10^5 células / poço) são incubados por 24-32 h na pre-
30 sença da mistura de peptídeos ou a porção imunogênica resultante em uma concentração de não mais que 20 μg por ml. As placas são subsequente-mente incubadas com anticorpos de anti-IFN- γ biotinilado seguido por uma

incubação de estreptavidina-fosfatase alcalina. As células produtoras de IFN- γ são identificadas adicionando BCIP/NBT (Sigma), o substrato relevante dando origem a manchas. Estas manchas podem ser enumeradas usando um microscópio de dissecação. É também uma possibilidade determinar a
5 presença de mRNA codificando para a citocina relevante pelo uso da técnica de PCR. Usualmente serão medidas uma ou mais citocinas utilizando por exemplo PCR, ELISPOT ou ELISA. Será apreciado por uma pessoa versada na técnica que um aumento ou diminuição significativos na quantidade de qualquer um destes pode ser usado citocinas induzidas por uma mistura de
10 peptídeos específica na avaliação da atividade imunológica do polipeptídeo.

- Uma resposta celular in vitro pode também ser determinado pelo uso de linhagens de células T derivadas de um indivíduo imune ou uma pessoa infetada onde as linhagens de células T foram dirigidas com bactérias vivas, extratos da célula bacteriana ou filtrado de cultura durante 10 a 20
15 dias com a adição de IL-2. A indução sendo executada por adição de não mais que 20 μ g de mistura de peptídeos por ml de suspensão para as linhagens de células T contendo de 1×10^5 células a 3×10^5 células por poço e incubação sendo executada de dois a seis dias. A indução de IFN- γ ou liberação de outra citocina relevante é detectada por ELISA. A estimulação das
20 células T pode também ser monitorada detectando a proliferação celular usando Timidina radioativamente marcada como descrito acima. Para ambos os ensaios uma resposta positiva sendo uma resposta mais que de base mais dois desvios-padrões.

- Uma resposta celular in vivo pode ser determinada como uma
25 resposta de DTH positiva após injeção intradérmica ou emplasto de aplicação local de no máximo 100 μ g do polipeptídeo ou a porção imunogênica para um indivíduo sendo clínica ou subcl clinicamente infetada com uma bactéria virulenta, uma resposta positiva tendo um diâmetro de pelo menos 5 mm 72-96 horas após a injeção ou aplicação.

- Uma resposta humoral in vitro é determinada por uma resposta
30 dos anticorpos específicos em um indivíduo imune ou infetado. A presença de anticorpos pode ser determinada por uma técnica de ELISA ou western

blot onde a mistura de peptídeos ou a porção imunogênica é absorvida em uma membrana de nitrocelulose ou uma superfície de poliestireno. O soro é preferivelmente diluído em PBS de 1:10 a 1:100 e adicionado à mistura de peptídeos absorvida e a incubação sendo executada de 1 a 12 horas. Pelo uso de anticorpos secundários marcados, a presença de anticorpos específicos pode ser determinada medindo a OD, por exemplo por ELISA, onde uma resposta positiva é uma resposta de mais que de base mais dois desvios-padrões ou alternativamente uma resposta visual em western blot.

• Outro parâmetro relevante é medição da proteção em modelos animais induzidos após vacinação com a mistura de peptídeos em um adjuvante ou após vacinação de DNA. Modelos animais adequados incluem primatas, cobaias ou camundongos, que são desafiados com uma infecção. Leitura para proteção induzida poderia ser diminuição da carga bacteriana em órgãos alvos comparados a animais não-vacinados, tempos de sobrevivência prolongados comparados a animais não-vacinados e perda de peso diminuída comparados a animais não-vacinados.

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

Em geral, os antígenos e as sequências de DNA que codificam tais antígenos podem ser preparados usando qualquer um de uma variedade de procedimentos.

A mistura de peptídeos pode ser produzida sinteticamente quando o fragmento de peptídeo tiver menos que cerca de 100 aminoácidos, e em geral menos que 50 aminoácidos e pode ser gerada usando técnicas bem conhecidas àqueles normalmente versados na técnica, tais como técnicas de fase sólida comercialmente disponíveis onde os aminoácidos são sequencialmente adicionados a uma cadeia de aminoácido crescente.

Na construção e preparação do DNA do plasmídeo que codifica a mistura de peptídeos como definida pela invenção para vacinação de DNA, uma cepa hospedeira tal como de *E. coli*, pode ser usada. DNA do plasmídeo pode depois ser preparado de culturas da cepa hospedeira que carrega o plasmídeo de interesse, e purificado usando por exemplo o kit de coluna Qiagen Giga-Plamid (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA) incluindo uma etapa

de remoção de endotoxina. Prefere-se que o DNA do plasmídeo usado para vacinação de DNA seja livre de endotoxina.

DIGESTO DE PROTEASE DOS ANTÍGENOS

Um conjunto de peptídeos sobrepostos pode ser feito por clivagem proteolítica da proteína intacta que pode ser expressa como uma proteína marcada recombinante por exemplo, *E. coli*, seguido por purificação através de cromatografia de coluna, tal como cromatografia de quelato de metal. Dois ou mais agentes de clivagem proteolítica podem ser selecionados que gerará fragmentos diferentes e assim coquetel de peptídeos sobrepostos. Enzimas proteolíticas, tais como tripsina, protease V-8, AspN ou quimotripsina ou agentes químicos, como CNBr ou BNPS-skatole, podem ser usadas. O número de sítios de clivagem e o comprimento dos fragmentos gerados são determinados pela sequência de aminoácidos da proteína e o agente de clivagem específico, por exemplo Asp-N hidrolisa proteínas no lado N-terminal dos resíduos de ácido aspártico e ácido cistéico. A protease V-8 cliva no lado carboxil do ácido glutâmico em tampão de bicarbonato de amônio em pH 7,8. Para enzimas proteolíticas, acoplamento da enzima às contas antes da clivagem é possível (16), e este acoplamento permitirá remoção da enzima após conclusão da clivagem mediante centrifugação das contas. Alternativamente, a protease pode ser removida da mistura de digestão através de métodos cromatográficos, tais como filtração em gel ou HPLC de fase reversa. Após digestão da proteína, análise de espectrometria de massa do digesto é executada para confirmar que a clivagem da proteína aconteceu como prognosticado. Por fim, as duas misturas de digestão podem ser combinadas para formar uma mistura de peptídeos sobrepostos.

VACINA DE PROTEÍNA

Uma vacinação com uma proteína recombinante induzirá uma resposta de células T para um número limitado de epítomos de peptídeos dominantes dentro desta proteína. Em contraste, vacinando com uma mistura de peptídeos sobrepostos, abrangendo a sequência de aminoácidos inteira da proteína, gerará uma resposta de células T contra um número aumentado de epítomos que são epítomos de peptídeos dominantes e subdominan-

tes.

Trata-se a invenção de uma composição de vacina compreendendo uma mistura de peptídeos de acordo com a invenção. Para assegurar desempenho otimizado de uma tal composição de vacina, prefere-se que ela
5 compreenda um veículo, carreador ou adjuvante imunológica e farmacêuticamente aceitável.

Uma vacina eficaz, em que uma mistura de peptídeos da invenção é reconhecida pelo animal, será capaz em um modelo animal de diminuir a carga bacteriana em órgãos alvos, prolongar os tempos de sobrevivência
10 e/ou diminuir a perda de peso após o desafio com um organismo infeccioso, comparado a animais não-vacinados ou quando dados como uma vacina preventiva ou terapêutica.

Veículos adequados são selecionados a partir do grupo de um diluente e um agente de suspensão. O adjuvante é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em DDA, Quil A, poly I:C, hidróxido de alumínio,
15 adjuvante incompleto de Freund, IFN- γ , IL-2, IL-12, lipídio de monofosforila A (MPL), Dimicolato de Trealose (TDM), TDB e dipeptídeo de muramila (MDP).

Um adjuvante é definido como uma substância que não-especificamente intensifica a resposta imune a um antígeno. Dependendo da
20 natureza do adjuvante, ele pode promover uma resposta imune mediada por célula, uma resposta imune humoral ou uma mistura das duas. Considerando que a intensificação da resposta imune seja não-específica, é bem entendido no campo que o mesmo adjuvante pode ser usado com antígenos diferentes para promover respostas contra alvos diferentes por exemplo com
25 um antígeno de *M. tuberculosis* para promover imunidade contra *M. tuberculosis* ou com um antígeno derivado de um tumor para promover imunidade contra tumores daquele tipo específico.

"Lipossomas" são definidos como estruturas de vesículas fechadas compostas de uma ou mais bicamadas de lipídio circundando um núcleo
30 aquoso. Cada bicamada de lipídio é composto de duas monocamadas de lipídio, cada uma desta tem uma região "cauda hidrofóbica" e uma região de cabeça "hidrófila". Na bicamada, as "caudas hidrofóbicas" das monocama-

das de lipídio orientam para o dentro da bicamada, enquanto as "cabeças hidrófilas" orientam para fora da bicamada. Lipossomas podem ter uma variedade de propriedades físicoquímicas tais como tamanho, composição de lipídio, carga de superfície, fluidez e número de membranas de bicamada.

5 De acordo com o número de bicamadas de lipídio, os lipossomas podem ser categorizados como vesículas unilamelares (UV) compreendendo uma bicamada de lipídio simples ou vesículas multilamelares (MLV) compreendendo duas ou mais bicamadas concêntricas, cada uma separada da próxima por uma camada de água. Compostos solúveis em água são capturados

10 dentro das fases aquosas/núcleo dos lipossomas opostos aos compostos lipofílicos que são capturados no núcleo das membranas de bicamada de lipídio.

A mistura de peptídeos usada para vacinação pode ser previamente misturada com lipossomas pré-formados como descrito

15 (WO2006002642, que é por este meio incorporado como referência) ou cada peptídeo pode ser misturado com os lipossomas pré-formados da mesma maneira, os peptídeos individuais formulados nos lipossomas são depois misturados antes da imunização.

A preparação padrão dos lipossomas é dissolver os lipídios em

20 um solvente orgânico que é depois evaporado até secar, deixando um filme de lipídio fino no lado de dentro do tubo de teste. O filme de lipídio seco é depois hidratado em uma quantidade apropriada de fase aquosa e a mistura é aquecida para temperatura de transição de fase dos lipídios e deixada "inchar-se". Os lipossomas resultantes que consistem em vesículas multilamelares (MLV) são dispersos agitando o tubo de teste.

25

Princípios diferentes para interação de um peptídeo ou misturas de peptídeos para lipossomas existem. Um método é associação de superfície (através de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas) dos peptídeos com os lipossomas por incubação dos peptídeos com lipossomas pré-formados

30 (19). É também possível fazer um acoplamento covalente de peptídeos à superfície dos lipossomas através de reticulação química (por exemplo como descrito na referência 20). Além disso, os peptídeos podem ser encapsula-

dos nos lipossomas através de métodos diferentes. Um método é adicionar os peptídeos diretamente no filme de lipídio seguido por reidratação. Outro método descreve acrescentando os peptídeos ao tampão usado para reidratação dos lipossomas do filme de lipídio. Além disso, os peptídeos podem ser encapsulados pelo método de desidratação-reidratação (21) em que um peptídeo é encapsulado através de secagem por congelamento seguido por reidratação dos lipossomas liofilizados. Alternativamente o antígeno é encapsulado usando a técnica de secagem por congelamento descrita por Pick (22) e por Bally et al. na Patente U. S. No. 4.975.282. Nesta técnica, as vesículas são misturadas com o antígeno de proteína e repetidamente congeladas em nitrogênio líquido e aquecidas para temperaturas acima da temperatura de transição de fase principal dos lipídios relevantes. As vesículas podem ser também processadas para remover qualquer antígeno não-capturado, por exemplo mediante lavagem e centrifugação.

Por fim, a mistura de peptídeos pode depois ser liberada pelos lipossomas de dois modos. Os peptídeos podem ser misturados antes da interação com os lipossomas ou os peptídeos podem ser misturados após a interação dos peptídeos individuais com os lipossomas como descrito acima.

Os peptídeos podem também ser encapsulados nos lipossomas acrescentando os peptídeos ao tampão usado para reidratação dos lipossomas de um filme de lipídio ou em forma secada por congelamento.

O polipeptídeo pode também ser modificado quimicamente sendo glicosilado, sendo lipidado (por exemplo por lipidação química com succinimida de palmitoilóxi como descrito por Mowat et al. 1991, marcação com PAM3Cys (18) ou com cloreto de dodecanoíla como descrito por Lustig et al. 1976), compreendendo grupos protéticos ou por conjugação direta com agonista de TLR (por exemplo, como descrito por Seder 2006).

Preparação de vacinas contendo sequências de peptídeo como ingredientes ativos é geralmente entendida na técnica, como exemplificado pelas patentes U. S. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231 e 4.599.230, todas incorporadas aqui por referência.

Outros métodos de alcançar efeito de adjuvante para a vacina

incluem uso de agentes tais como hidróxido de alumínio ou fosfato (alume), polímeros sintéticos de açúcar (Carbopol), agregação da proteína na vacina através de tratamento de calor, agregação reativando com anticorpos tratados com pepsina (Fab) para albumina, mistura com células bacterianas tais como *C. parvum* ou endotoxinas ou componentes lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas, emulsão em veículos oleosos fisiologicamente aceitáveis tais como mono-oleato de manida (Aracel A) ou emulsão com 20 por cento de solução de um perfluorocarboneto (Fluosol-DA) usado como um substituto de bloco podem também ser empregadas. Outras possibilidades envolvem o uso de substâncias imunomoduladoras, tais como citocinas, ou indutores de IFN- γ sintéticos, tais como poly I:C, em combinação com os adjuvantes supracitados.

Outra possibilidade interessante para alcançar efeito de adjuvante é empregar a técnica descrita em (17) (que é por este meio incorporada aqui por referência). Em resumo, um antígeno relevante, tal como um antígeno da presente invenção, pode ser conjugado com um anticorpo (ou fragmento de anticorpo de ligação de antígeno) contra os receptores de Fc γ em monócitos/macrófagos.

As vacinas são administradas de uma maneira compatível com a formulação de dosagem, e em tal quantidade como será terapeuticamente eficaz e imunogênica. A quantidade a ser administrada depende do sujeito a ser tratado, incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imune do indivíduo para montar uma resposta imune, e do grau de proteção desejado. Faixas de dosagem adequadas são da ordem de vários cem microgramas de ingrediente ativo por vacinação com uma faixa preferida de cerca de 0,1 μ g a 1000 μ g, tal como na faixa de cerca de 1 μ g a 300 μ g, e especialmente na faixa de cerca de 10 μ g a 50 μ g. Regimes adequados para administração inicial e injeções de reforço são também variáveis mas são tipificados por uma administração inicial seguido por inoculações subsequentes ou outras administrações.

A maneira de aplicação pode ser amplamente variada. Quaisquer dos métodos convencionais para administração de uma vacina são a-

plicáveis. Estes são acreditados incluir aplicação oral em uma base sólida fisiologicamente aceitável ou em uma dispersão fisiologicamente aceitável, parenteralmente, através de injeção ou outros. A dosagem da vacina dependerá da rota de administração e variará de acordo com a idade da pessoa a ser vacinada e, para um grau mínimo, o tamanho da pessoa a ser vacinada.

As vacinas são administradas de modo convencional parenteralmente, através de injeção, por exemplo, ou subcutânea e intramuscularmente. Formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração incluem supositórios e, em alguns casos, formulações orais.

Para supositórios, aglutinantes e veículos tradicionais podem incluir, por exemplo, polialcaleno glicóis ou triglicerídeos; tais supositórios podem ser formados de misturas contendo o ingrediente ativo na faixa de 0,5% a 10%, preferivelmente 1-2%. Formulações orais incluem tais excipientes normalmente empregados como, por exemplo, tipos farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, e outros. Estas composições tomam a forma de soluções, suspensões, tabletes, pílulas, cápsulas, formulações de liberação contínua ou pós e vantajosamente contêm 10-95% de ingrediente ativo, preferivelmente 25-70%.

Em muitas circunstâncias, será necessário ter administrações múltiplas da vacina. Especialmente, vacinas podem ser administradas para impedir uma infecção. Quando administradas para impedir uma infecção, a vacina é profilaticamente dada, antes dos sinais ou sintomas clínicos definitivos de uma infecção estarem presentes. Uma vez que as vacinas atuais, por exemplo BCG, parecem induzir uma resposta imune eficaz, mas de vida curta, vacinas profiláticas podem também ser projetadas para serem usadas como vacinas de reforço. Tais vacinas são dadas a indivíduos que previamente receberam uma vacinação, com a intenção de prolongar o período de proteção.

Em circunstâncias onde o indivíduo já foi infetado ou é suspeito de ter sido infetado, a vacinação anterior pode ter fornecido imunidade suficiente para impedir a doença primária, mas como previamente debatido, re-

forçando esta resposta imune não ajudará contra a infecção latente. Em uma tal situação, a vacina tem uma vantagem particular como uma vacina terapêutica projetada para eficácia contra o estágio latente de infecção.

Essencialmente em doenças crônicas, tais como TB, câncer, 5 hepatite e HIV, o equilíbrio a longo prazo entre o hospedeiro e o patógeno frequentemente resulta em respostas imunes focalizadas para alguns epítomos imunodominantes. Indução de uma resposta equilibrada ampla para uma faixa de epítomos dentro de uma proteína dada não pode ser alcançada imunizando com a proteína recombinante que apenas levará a uma resposta 10 para um número limitado de epítomos dominantes. Porém em contraste, a presente invenção ensina que vacinando com uma mistura de peptídeos sobrepostos induz uma resposta imune de células T para uma faixa de epítomos, incluindo epítomos subdominantes, dentro de uma proteína dada. A presente invenção e a indução de respostas para epítomos subdominantes têm 15 uma vantagem particular portanto nestas doenças porque ela pode induzir uma resposta imune contra epítomos protetores que não são induzidos pela própria doença crônica, ou vacinando com a proteína dada em uma forma de comprimento total recombinante. Por vacinação preventiva convencional ou pós-exposição de uma maneira terapêutica a aplicação da tecnologia de va- 20 cina com mistura de peptídeos é superior e com atividade muito mais alta que as vacinas convencionais com base em moléculas inteiras contra estas doenças crônicas.

Além disso, para doenças crônicas onde imunidade humoral é importante, é possível induzir uma resposta ampla e otimizada de células T e 25 uma resposta de células B máxima para a mesma proteína. Nesta situação imunização primária é feita com uma mistura de peptídeos sobrepostos (em um adjuvante) abrangendo a sequência inteira de uma proteína dada e o reforço é alcançado com uma segunda vacina compreendendo a mesma proteína em forma recombinante em um adjuvante. Desse modo a resposta 30 de células T ampla contra ambos epítomos dominantes e subdominantes permitirá atividade de célula T-helper máxima e assim uma resposta de anticorpo muito forte. A resposta resultante é uma resposta de células T ampla e

de anticorpo máxima para o mesmo antígeno, com uso de particular contra doenças crônicas.

LENGENDAS DA FIGURA

FIGURA 1.

5 A. Visão geral dos peptídeos sobrepostos de ESAT-6. B. Sequência de aminoácidos de Δ -ESAT-6

FIGURA 2. Imunogenicidade de ESAT6 e Δ 15ESAT6 em esplenócitos

10 Grupos de camundongos F1 (Balb/cxC57BL/6) foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com qualquer solução salina, ESAT6 ou Δ 15ESAT6 em DDA/TDB. Três semanas após a vacinação final, as células do baço foram analisadas por ELISA para secreção de estimulação de IFN-gama seguindo com 1 micrograma/ml de ESAT6, Δ 15ESAT6 ou um dos 13 peptídeos sobrepostos que abrangem a
15 sequência de ESAT6 (P1-P13 como indicado na figura, também mostrado na figura 1).

FIGURA 3. Eficácia protetora de ESAT6 e Δ 15ESAT6

20 Grupos de camundongos F1 (Balb/cxC57BL/6) foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com qualquer solução salina, BCG, ou DDA/TDB com ESAT6 ou Δ 15ESAT6. Seis semanas após a última vacinação, os camundongos foram desafiados com M.tb virulenta. Seis semanas pós-desafio, os camundongos foram mortos e a carga bacteriana (CFU) foi medida no pulmão.

FIGURA 4. Peptídeos sobrepostos de TB10.4, P1-P9

25 FIGURA 5. Vacinação com TB10 recombinante seguido por estimulação in vitro com peptídeos individuais P1-P9. Respostas de IFN- γ in vitro de células de camundongos vacinados três vezes com DDA/TDB-TB10.4 em DDA/TDB. Células extraídas duas semanas após a vacinação final de sangue e estimuladas com 0,5 ug/ml do peptídeo indicado.

30 FIGURA 6. Reconhecimento de peptídeos de TB10-4 P1-P9 seguindo vacinação com peptídeos individuais.

Respostas de IFN- γ in vitro de células de camundongos vacina-

dos três vezes com peptídeos de TB10.4 individuais em DDA/TDB. Células extraídas duas semanas após a vacinação final de sangue e estimuladas com 0,5 ug/ml do mesmo peptídeo usado para a vacinação e a secreção de IFN- γ foi determinado por ELISA.

5 FIGURA 7. Habilidade protetora de peptídeos de TB10-4 P1-P9.

Carga bacteriana em camundongos vacinados (expressa como \log_{10} em proteção de CFU) desafiados pela rota de aerossol com M.tb virulenta seis semanas após a última vacinação. Seis semanas pós-desafio, os camundongos foram mortos e a carga bacteriana (CFU) foi medida no pulmão. (* $P < 0,05$ comparados a camundongos não-vacinados, ANOVA e teste de Tukey).

10

FIGURA 8. Reconhecimento de peptídeos de TB10-4 P1-P9 após vacinar com mistura de peptídeos de TB10-4. Respostas de IFN- γ in vitro de células de camundongos vacinados três vezes com DDA/TDB-TB10.4-mistura de peptídeo. Células extraídas duas semanas após vacinação final de sangue e estimuladas com 0,5 ug/ml de peptídeo ou proteína de TB10.4 como indicado.

15

FIGURA. 9. Carga bacteriana em camundongos vacinados com peptídeo de TB10.4 ou TB10.4 infectados com M.tb

Carga bacteriana em camundongos vacinados (expressa como \log_{10} em CFU) comparados aos controles não-vacinados desafiados pela rota de aerossol com M.tb virulenta dez semanas após a primeira vacinação. Seis semanas pós-desafio, os camundongos foram mortos e a carga bacteriana (CFU) foi medida no pulmão. (* $P < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey).

20

FIGURA 10.

25

Visão geral dos peptídeos sobrepostos de CT521.

FIGURA 11

Os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 2 semanas com uma mistura de todos os peptídeos de ESAT-6 (P1-P13), e a resposta imune, como medida por secreção de IFN-gama, foi investigada cultivando células sanguíneas com cada um dos peptídeos de ESAT-6 individuais P1-P13.

30

FIGURA 12

Os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 2 semanas com mistura de peptídeos de ESAT-6 ou ESAT-6 (P1-P13). 6 semanas após a última vacinação, os camundongos foram submetidos a um desafio de aerossol com *M.tb* virulenta. 10 semanas após o desafio, os camundongos foram mortos e os números bacterianos foram determinados nos pulmões.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1:

ESAT-6.

Para examinar a que grau que o antígeno expresso por *Mycobacteria tuberculosis* ESAT-6 contém epítomos dominantes e subdominantes, os camundongos foram vacinados com a proteína recombinante ESAT-6 3 vezes em intervalo de 2 semanas e células extraídas duas semanas após a vacinação final de sangue e estimuladas com os peptídeos de ESAT-6 indicados (Figura 1A) onde, após secreção de IFN-gama, como avaliado por ELISA, foi determinado. Os resultados mostraram uma indução de células T produtoras de IFN-gama específicas para P1 e para um P2 de grau mínimo. Removendo o epítomo imunodominante P1 de ESAT6 (dando a construção nomeada " Δ 15-ESAT-6 em que os aminoácidos 1-15 foram deletados" (Figura 1B)) levou ao reconhecimento imune de epítomos novos, P2 e em particular P3 (Figura 2). Isto demonstrou que P1 é um epítomo dominante, e que P2 e P3 constituem epítomos subdominantes (mas imunogênicos).

A seguir foi examinado se os epítomos subdominantes puderam conferir proteção contra infecção com *M.tb*. Camundongos foram subcutaneamente vacinados três vezes em intervalos de duas semanas com qualquer solução salina, BCG, ou DDA/TDB com ESAT6 ou Δ 15ESAT6. Seis semanas após a última vacinação, os camundongos foram desafiados com *M.tb* virulenta. Seis semanas pós-desafio, os camundongos foram mortos e a carga bacteriana (CFU) foi medida no pulmão.

Experimentos de proteção mostraram que Δ 15-ESAT-6 foi mais protetor que ESAT-6 (Figura 3), indicando que os peptídeos subdominantes (epítomos) P2 e P3 puderam de fato induzir uma resposta imune que a pro-

teção mediada contra infecção com *M.tb*.

A seguir foi examinado se a vacinação com uma mistura de todos os peptídeos sobrepostos de ESAT-6 levaram a um reconhecimento mais amplo de P1-P13 comparado aos camundongos vacinados com a proteína recombinante ESAT-6. Os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 2 semanas com uma mistura de todos os peptídeos, e a resposta imune foi investigada cultivando células sanguíneas com cada um dos peptídeos de ESAT-6 individuais P1-P13 (Figura 11).

Os resultados mostraram que, em contraste com vacinação com proteína recombinante ESAT-6, vacinação com uma mistura de peptídeos de ESAT-6 (P1-P13) conduziu a um reconhecimento mais amplo dos peptídeos (Figura 11).

Para examinar se a resposta mais ampla para ESAT-6 foi refletida na proteção contra infecção com *M. tuberculosis*, como comparado à proteína induzida por vacinação com a proteína recombinante ESAT-6, os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 2 semanas com ESAT-6 ou mistura de peptídeos de ESAT-6. 6 semanas após a última vacinação, os camundongos foram submetidos a um desafio de aerossol com *M.tb* virulenta. 10 semanas após o desafio, os camundongos foram mortos e os números bacterianos foram determinados nos pulmões.

Os resultados mostraram que os camundongos não só vacinados com a mistura de peptídeo de ESAT-6 exibiram um reconhecimento mais amplo de ESAT-6, mas foram também significativo mais protegidos contra infecção com *M.tb* comparados aos camundongos vacinados com a proteína recombinante ESAT-6 (Figura 12). Desse modo, vacinando com uma mistura de peptídeos de ESAT-6 leva a um reconhecimento mais amplo de epítomos de ESAT-6 que por sua vez induz uma proteção mais alta significativa contra infecção com *M.tb*, comparado à vacina com a proteína recombinante ESAT-6.

30 EXEMPLO 2: TB10.4.

A seguir analisamos outra proteína, expressa por *M.tb*., TB10.4.

Os camundongos foram vacinados 3 vezes em intervalo de 2 semanas com TB10.4 recombinante, e as células foram extraídas duas semanas após a vacinação final de sangue e estimuladas com 0,5 ug/ml dos peptídeos de TB10.4 indicados (Figura 4) e secreção de IFN-gama, como avaliado por ELISA, foi determinada.

Os resultados mostraram que vacinação principalmente com TB10.4 induziu células T específicas para P3 (Figura5). P3 portanto constituiu um epítipo dominante.

EXEMPLO 3:

Para analisar se a falta de células T respondendo aos peptídeos P1, P2, P4, P5, P6, e P9 (e até certo ponto P7 e P8) foi devido a estes epítopos peptídicos que são subdominantes ou não-imunogênicos, a seguir vacinamos com os peptídeos de TB10.4 individuais (P1-P9). Seguindo vacinação, os linfócitos purificados foram estimulados in vitro nos mesmos peptídeos usados para vacinação e secreção de IFN- γ foi determinada por ELISA. Os resultados mostraram que outros peptídeos subdominantes (ao vacinar com a proteína recombinante TB10.4) foram também fortemente imunogênicos. Em particular, vacinação com peptídeo 1 ou 3, ou a um grau mínimo P7, P8, ou P9 induziram uma resposta de células T específica (Figura 6).

Além disso, os peptídeos subdominantes, em particular P1, P7, P8, P9 todos protegeram contra a infecção com M.tb. (Figura 7). Vacinação com o epítipo de peptídeo dominante P3 também induziu proteção significativa.

EXEMPLO 4:

Tendo determinado a existência de epítopos subdominantes ao vacinar com a proteína recombinante TB10.4 a seguir examinamos se a vacinação com uma mistura de todos os peptídeos sobrepostos de TB10.4 levou a um reconhecimento mais amplo de P1-P9 comparado aos camundongos vacinados com a proteína recombinante TB10.4. Os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 2 semanas com uma mistura de todos os peptídeos, e a resposta imune foi investigada cultivando as células sanguíneas com cada um dos peptídeos de TB10.4 individuais P1-P9 (Figura 8).

ra 8).

Os resultados mostraram que, em contraste com a vacinação com proteína recombinante TB10.4, vacinando com uma mistura de peptídeos de TB10.4 (P1-P9) levou a um reconhecimento muito mais amplo dos peptídeos. Em particular, P1, P3, e P8 foram fortemente todos reconhecidos (Figura 8).

EXEMPLO 5:

Para examinar se a resposta mais ampla para TB10.4 foi refletida na proteção contra infecção com *M. tuberculosis*, como comparado à proteína induzida por vacinação com a proteína recombinante TB10.4, os camundongos foram vacinados três vezes em intervalos de 2 semanas com TB10.4 ou mistura de peptídeos de TB10.4. 6 semanas após a última vacinação, os camundongos foram submetidos a um desafio de aerossol com *M.tb* virulenta. 6 semanas após o desafio, os camundongos foram mortos e os números bacterianos foram determinados nos pulmões.

Os resultados mostraram que os camundongos não só vacinados com mistura de peptídeos de TB10.4 exibiram um reconhecimento mais amplo de TB10.4, mas foram também significativos mais protegidos contra infecção com *M.tb* comparados aos camundongos vacinados com a proteína recombinante TB10.4 (Figura 9). Desse modo, vacinação com uma mistura de peptídeos de TB10.4 levou a um reconhecimento mais amplo de epítomos de TB10.4, que por sua vez levou uma proteção mais alta significativa contra infecção com *M.tb*, comparada à vacinação com a proteína recombinante TB10.4.

EXEMPLO 5:

ct521

Os camundongos foram vacinados 3 vezes em intervalo de 2 semanas com CT521 recombinante ou uma mistura de peptídeos sobrepostos de CT521 (Figura 10), e células extraídas duas semanas após vacinação final de sangue ter sido estimulada com 0,5 ug/ml de cada um dos peptídeos de CT521. Secreção de IFN-gama, como avaliado por ELISA, foi determinada para examinar se vacinação com uma mistura de peptídeos de CT521

levou a um reconhecimento mais amplo de CT521, comparada à vacinação com a proteína de CT521 recombinante.

REFERÊNCIAS

- 5 1. Paul, W. 1999. Fundamental Immunology, quarta edição, Lippincott-Raven.
2. Sette, A., e J. Fikes. 2003. Curr Opin Immunol 15:461.
3. van der Most, R. G., K. Murali-Krishna, J. G. Lanier, E. J. Wherry, M. T. Puglielli, J. N. Blattman, A. Sette, e R. Ahmed. 2003. Virology 315:93.
- 10 4. Crowe, S. R., S. J. Turner, S. C. Miller, A. D. Roberts, R. A. Rappolo, P. C. Doherty, K. H. Ely, e D. L. Woodland. 2003. J Exp Med 198:399.
5. Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, e R. Ahmed. 2003. J Virol 77:4911.
- 15 6. Kamath, A. B., J. Woodworth, X. Xiong, C. Taylor, Y. Weng, e S. M. Behar. 2004. J Exp Med 200:1479.
7. Olsen, A. W., P. R. Hansen, A. Holm, e P. Andersen. 2000. Eur J Immunol 30:1724.
8. McMichael, A. J., e R. E. Phillips. 1997. Annu Rev Immunol 20 15:271.
9. Mowat et al. 1991, Immunology 72(3):317-22
10. Lustig et al. 1976, Cell Immunol 24(1):164-7
11. Wille-Reece, U., C. Y. Wu, B. J. Flynn, R. M. Kedl, e R. A. Seder. 2005. J. Immunol. 174:7676.6
- 25 12. Thompson J., et al. Nucleic Acids Res 1994 22:4673-4680
13. Ravn, P. et al. 1999. J. Infect. Dis. 179:637-645
14. Stryhn, A., et al. 1996 Eur. J. Immunol. 26:1911-1918
15. Harboe, M., et al. 1998 Infect. Immun. 66:2; 717-723
16. Krogh, TN, Berg, T, & Hojrup, P. (1999). Anal. Biochem. 274, 30 153-162
17. Gosselin et al., 1992. J. Immunol. 149: 3477-3481
18. Babu et al.. 1995. Vaccine 13:1669-76.

19. Davidsen et al. (2005). *Biochim Biophys Acta*. 1718: 22-31.
20. Munoz et al. (2004). *Int J Pharm* 269:177-84.
21. Kirby & Gregoriadis. 1984. 2 : 979-984.
22. Pick U. 1981. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 186-194.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

5 <110> Statens serum institut
 <120> EXPANSÃO DO REPERTÓRIO DE CÉLULAS T PARA INCLUIR EPÍTOPOS SUBDO-
 MINANTES ATRAVÉS DA VACINAÇÃO COM ANTÍGENOS LIBERADOS COMO
 FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS OU COQUETÉIS DE PEPTÍDEO
 <130> 44272PC01
 <150> PCT/DK2007/000312
 <151> 2007-06-26
 <160> 36
 10 <170> PatentIn versão 3.5
 <210> 1
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 15 <220>
 <223> ESAT6
 <400> 1
 Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 20 Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
 20 25 30
 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Thr Glu Leu
 25 50 55 60
 Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln
 65 70 75 80
 Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 85 90
 30 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> ESAT6-P1
 <400> 2
5 Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
10 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> ESAT6-P2
 <400> 3
 Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn
15 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
20 <220>
 <223> ESAT6-P3
 <400> 4
 Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu
 1 5 10 15
25 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
30 <223> ESAT6-P4
 <400> 5
 Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser

	1	5	10	15
	<210>	6		
	<211>	15		
	<212>	PRT		
5	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
	<220>			
	<223>	ESAT6-P5		
	<400>	6		
	Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala			
10	1	5	10	15
	<210>	7		
	<211>	15		
	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
15	<220>			
	<223>	ESAT6-P6		
	<400>	7		
	Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly			
	1	5	10	15
20	<210>	8		
	<211>	15		
	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
	<220>			
25	<223>	ESAT6-P7		
	<400>	8		
	Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln			
	1	5	10	15
	<210>	9		
30	<211>	15		
	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		

<220>
 <223> ESAT6-P8
 <400> 9
 Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr
5 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
10 <220>
 <223> ESAT6-P9
 <400> 10
 Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu
 1 5 10
15 <210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
20 <223> ESAT6-P10
 <400> 11
 Thr Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr
 1 5 10
 <210> 12
25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> ESAT6-P11
30 <400> 12
 Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 5 <220>
 <223> ESAT6-P12
 <400> 13
 Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn
 1 5 10 15
 10 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 15 <223> ESAT6-P13
 <400> 14
 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 1 5 10 15
 <210> 15
 20 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> delta15-ESAT6 (ESAT6 em que os aminoácidos 1-15 tem sido deletados)
 25 <400> 15
 Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly
 20 25 30
 30 Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Thr Glu
 35 40 45
 Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly

	50	55	60
	Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala		
	65	70	75
	<210>	16	
5	<211>	96	
	<212>	PRT	
	<213>	Mycobacterium tuberculosis	
	<220>		
	<223>	TB10.4	
10	<400>	16	
	Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly		
	1	5	10 15
	Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile		
		20	25 30
15	Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly		
		35	40 45
	Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp		
		50	55 60
	Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr		
20	65	70	75 80
	Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly		
		85	90 95
	<210>	17	
	<211>	18	
25	<212>	PRT	
	<213>	Mycobacterium tuberculosis	
	<220>		
	<223>	TB10.4-P1	
	<400>	17	
30	Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly		
	1	5	10 15
	Asp Met		

<210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
5 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> TB10.4-P2
 <400> 18
 Met Leu Gly His Ala Gly Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln
10 1 5 10 15
 Ser Leu

 <210> 19
 <211> 18
15 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> TB10.4-P3
 <400> 19
20 Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile Ala Val Glu Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala

 <210> 20
25 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> TB10.4-P4
30 <400> 20
 Glu Ile Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp
 1 5 10 15

Thr Gly

5 <210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> TB10.4-P5
 <400> 21

10 Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala
 1 5 10 15
 Gln Trp

15 <210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <223> TB10.4-P6
 <400> 22

20 Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp Leu Val
 1 5 10 15
 Arg Ala

25 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>

30 <223> TB10.4-P7
 <400> 23

Ala Met Glu Asp Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His

	1	5	10	15
	Glu Ala			
	<210>	24		
5	<211>	18		
	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
	<220>			
	<223>	TB10.4-P8		
10	<400>	24		
	Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr Met Ala Met Met Ala Arg			
	1	5	10	15
	Asp Thr			
15	<210>	25		
	<211>	16		
	<212>	PRT		
	<213>	Mycobacterium tuberculosis		
	<220>			
20	<223>	TB10.4-P9		
	<400>	25		
	Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly			
	1	5	10	15
	<210>	26		
25	<211>	138		
	<212>	PRT		
	<213>	Chlamydia trachomatis		
	<220>			
	<223>	CT521		
30	<400>	26		
	Met Leu Met Pro Lys Arg Thr Lys Phe Arg Lys Gln Gln Lys Gly Gln			
	1	5	10	15

Phe Ala Gly Leu Ser Lys Gly Ala Thr Phe Val Asp Phe Gly Glu Phe
 20 25 30
 Gly Met Gln Thr Leu Glu Arg Gly Trp Ile Thr Ser Arg Gln Ile Glu
 35 40 45
5 Ala Cys Arg Val Ala Ile Asn Arg Tyr Leu Lys Arg Lys Gly Lys Val
 50 55 60
 Trp Ile Arg Val Phe Pro Asp Lys Ser Val Thr Lys Lys Pro Ala Glu
 65 70 75 80
 Thr Arg Met Gly Lys Gly Lys Gly Ala Pro Asp His Trp Val Val Val
10 85 90 95
 Val Arg Pro Gly Arg Ile Leu Phe Glu Val Ala Asn Val Ser Lys Glu
 100 105 110
 Asp Ala Gln Asp Ala Leu Arg Arg Ala Ala Ala Lys Leu Gly Ile Arg
 115 120 125
15 Thr Arg Phe Val Lys Arg Val Glu Arg Val
 130 135
 <210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
20 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P1
 <400> 27
 Met Leu Met Pro Lys Arg Thr Lys Phe Arg Lys Gln Gln Lys Gly Gln
25 1 5 10 15
 Phe Ala Gly Leu Ser Lys
 20
 <210> 28
 <211> 23
30 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>

<223> CT521-P2
 <400> 28
 Lys Gly Gln Phe Ala Gly Leu Ser Lys Gly Ala Thr Phe Val Asp Phe
 1 5 10 15
5 Gly Glu Phe Gly Met Gln Thr
 20
 <210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
10 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P3
 <400> 29
 Val Asp Phe Gly Glu Phe Gly Met Gln Thr Leu Glu Arg Gly Trp Ile
15 1 5 10 15
 Thr Ser Arg Gln Ile Glu Ala
 20
 <210> 30
 <211> 23
20 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P4
 <400> 30
25 Gly Trp Ile Thr Ser Arg Gln Ile Glu Ala Cys Arg Val Ala Ile Asn
 1 5 10 15
 Arg Tyr Leu Lys Arg Lys Gly
 20
 <210> 31
30 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis

<220>
 <223> CT521-P5
 <400> 31
 Ala Ile Asn Arg Tyr Leu Lys Arg Lys Gly Lys Val Trp Ile Arg Val
5 1 5 10 15
 Phe Pro Asp Lys Ser Val Thr
 20
 <210> 32
 <211> 23
10 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P6
 <400> 32
15 Ile Arg Val Phe Pro Asp Lys Ser Val Thr Lys Lys Pro Ala Glu Thr
 1 5 10 15
 Arg Met Gly Lys Gly Lys Gly
 20
 <210> 33
20 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P7
25 <400> 33
 Lys Pro Ala Glu Thr Arg Met Gly Lys Gly Lys Gly Ala Pro Asp His
 1 5 10 15
 Trp Val Val Val Val Arg Pro
 20
30 <210> 34
 <211> 23
 <212> PRT

<213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P8
 <400> 34
5 Pro Asp His Trp Val Val Val Val Arg Pro Gly Arg Ile Leu Phe Glu
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Val Ser Lys Glu
 20
 <210> 35
10 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
 <223> CT521-P9
15 <400> 35
 Ile Leu Phe Glu Val Ala Asn Val Ser Lys Glu Asp Ala Gln Asp Ala
 1 5 10 15
 Leu Arg Arg Ala Ala Ala Lys
 20
20 <210> 36
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <220>
25 <223> CT521-P10
 <400> 36
 Asp Ala Leu Arg Arg Ala Ala Ala Lys Leu Gly Ile Arg Thr Arg Phe
 1 5 10 15
 Val Lys Arg Val Glu Arg Val
30 20

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina contra uma doença crônica tal como uma infecção bacteriana, viral ou parasitária ou câncer compreendendo uma mistura de peptídeos que consiste em peptídeos sobrepostos adjacentes abrangendo toda a sequência de aminoácidos de uma proteína que é expressa durante a fase crônica da doença.

2. Vacina de acordo com a reivindicação 1, também compreendendo um adjuvante onde o adjuvante é catiônico.

3. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que um ou mais dos peptídeos são quimicamente modificados.

4. Vacina de acordo com a reivindicação 1, em que cada peptídeo é incorporado individualmente nos lipossomas antes de fazer a mistura.

5. Vacina de acordo com as reivindicações 1-4, em que os peptídeos são de 10 a 30 aminoácidos de comprimento, preferivelmente 12-20 aminoácidos de comprimento.

6. Vacina de acordo com a reivindicação 1 a 5, em que a sobreposição com o peptídeo adjacente é de 6-20 aminoácidos, preferivelmente 10-12 aminoácidos.

7. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a proteína é selecionada a partir de uma bactéria, tal como uma micobactéria virulenta, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* ou *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* ou *Chlamydia trachomatis*, ou um vírus, tal como o da hepatite B ou C, ou um parasita, tal como *Leishmania species*, ou o parasita *Plasmodium falciparum* causador de malária ou a partir de moléculas expressas em tumores malignos.

8. Vacina de acordo com a reivindicação 7, em que os peptídeos são de uma proteína selecionada a partir de *M. Tuberculosis*, tal como E-SAT6, Ag85A, Ag85B ou TB10.4, ou a partir de *Chlamydia trachomatis*, tal como CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 ou CT681, ou a partir de um vírus da hepatite ou a partir de *Plasmodium falciparum*, tal como Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 ou CSP.

9. Vacina de acordo com a reivindicação 1 a 8, em que um ou mais dos peptídeos são quimicamente modificados.

10. Vacina de acordo com a reivindicação 9, em que um ou mais dos peptídeos são quimicamente modificados sendo glicosilados, lipidados, marcados com PAM3Cys ou cloreto de dodecanoíla, ou compreendendo grupos protéticos, ou contendo aminoácidos adicionais, ou por conjugação direta com agonista lipidado de TLR.

11. Vacina de acordo com a reivindicação 1 a 10, liberada em um sistema de liberação tal como um adjuvante.

12. Vacina de acordo com a reivindicação 11, em que o adjuvante é à base de lipossomas catiônicos.

13. Vacina de acordo com a reivindicação 11 a 12, em que os peptídeos são liberados encapsulados nos lipossomas onde a mistura de peptídeos é incorporada nos lipossomas ou cada peptídeo é individualmente incorporado nos lipossomas antes de fazer a mistura.

14. Vacina de acordo com a reivindicação 11 a 13, em que o adjuvante é DDA/TDB.

15. Método de preparar uma vacina de acordo com a reivindicação 1 a 14, em que a mistura de peptídeos é preparada por clivagem proteolítica da proteína com dois ou mais agentes de clivagem proteolítica.

16. Método de preparar uma vacina de acordo com a reivindicação 15, em que o agente de clivagem proteolítica é escolhido dentre enzimas proteolíticas tal como tripsina, protease V-8, AspN ou quimotripsina ou escolhido dentre agentes químicos tais como CNBr ou BNPS-skatole.

17. Método para profilaxia ou tratamento de uma doença crônica em um animal, incluindo um ser humano, compreendendo administrar ao animal a vacina de acordo com a reivindicação 1 a 14.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que a profilaxia ou tratamento é reforçado administrando uma segunda vacina compreendendo a proteína inteira abrangida pela mistura de peptídeos em adjuvante ou expressa em um sistema de liberação vivo.

A

```
ESAT6      MTEQOWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKWDATTELNALQNLARTISEAGQAMASTE GNVVTGMFA
ESAT6-P1   MTEQOWNFAGIEAAA
ESAT6-P2   NFAGIEAAASAIQGN
ESAT6-P3   ASAIQGNVTSIHSL
ESAT6-P4   NVTsiHSLLDGKQs
ESAT6-P5   SLLDEGKQSLTKLAA
ESAT6-P6   KQSLTKLAAAWGGSG
ESAT6-P7   AAWGGSGSEAYQGVQ
ESAT6-P8   GSEAYQGVQKWDAT
ESAT6-P9   QQKWDATTELNAL
ESAT6-P10  TTELNALQNLART
ESAT6-P11  ALQNLARTISEAGQA
ESAT6-P12  TISEAGQAMASTE GNVVTGMFA
ESAT6-P13  QAMASTE GNVVTGMFA
```

B

```
Δ15-ESAT6  SAIQGNVTSIHSLLDGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKWDATTELNALQNLARTI-
SEAGQAMASTE GNVVTGMFA
```

FIG. 1

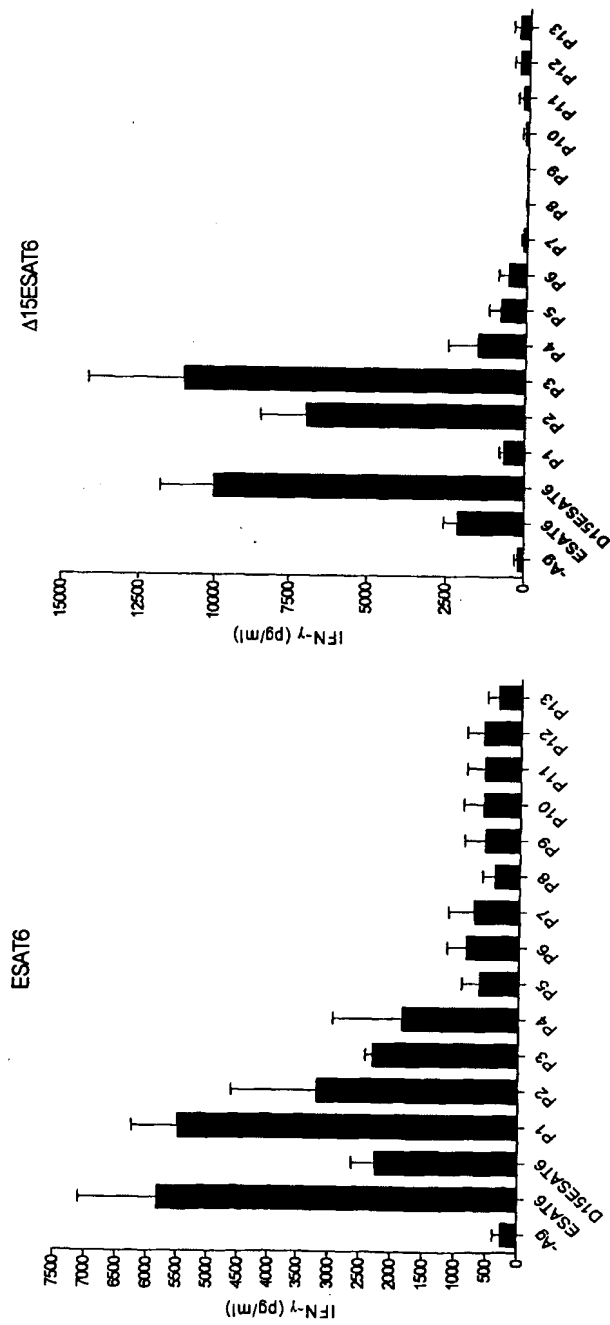


FIG. 2

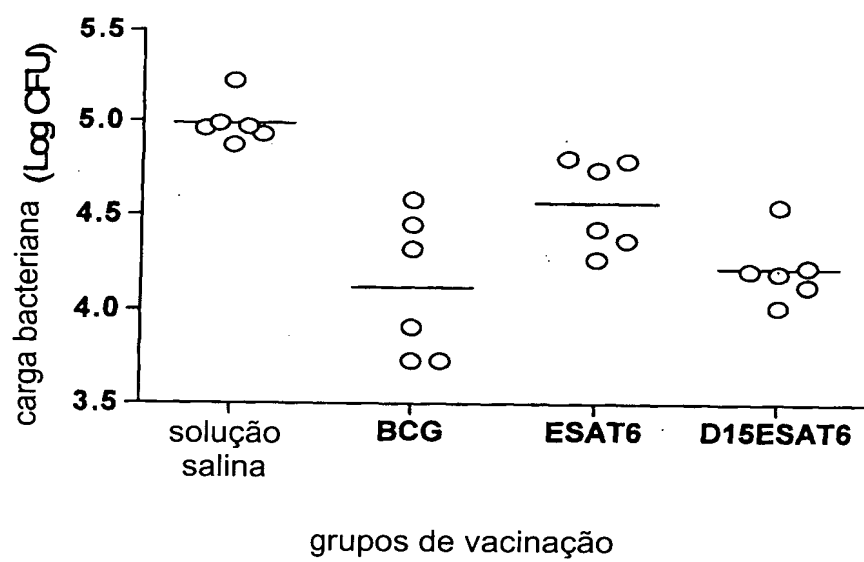


FIG. 3

TB10.4	MSQIMYNYPAMLGHAGDMAGYAGTLQSLGAEIAVEQAALQSAWQGDTCITYQAWQAQWNQAMEDLVRAHAMSSSTHEANTMAMMARDTAEAAKWGG
TB10.4-P1	MSQIMYNYPAMLGHAGDM
TB10.4-P2	MLGHAGDMAGYAGTLQSL
TB10.4-P3	YAGTLQSLGAEIAVEQAA
TB10.4-P4	EIAVEQAALQSAWQGDTC
TB10.4-P5	SAWQGDTCITYQAWQAQW
TB10.4-P6	YQAWQAQWNQAMEDLVRA
TB10.4-P7	AMEDLVRAHYHAMSSSTHEA
TB10.4-P8	AMSSSTHEANTMAMMARDT
TB10.4-P9	MAMMARDTAEAAKWGG

FIG. 4

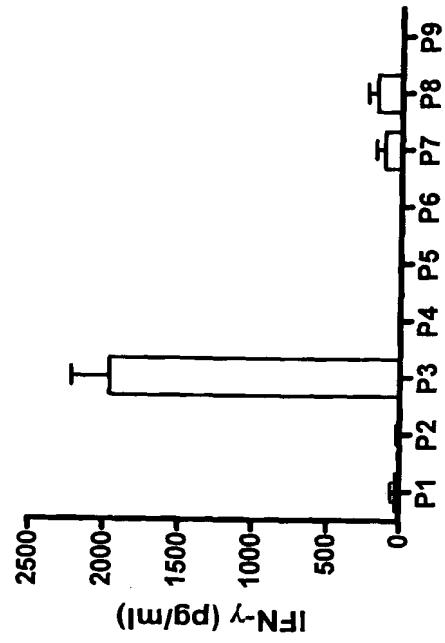


FIG. 5

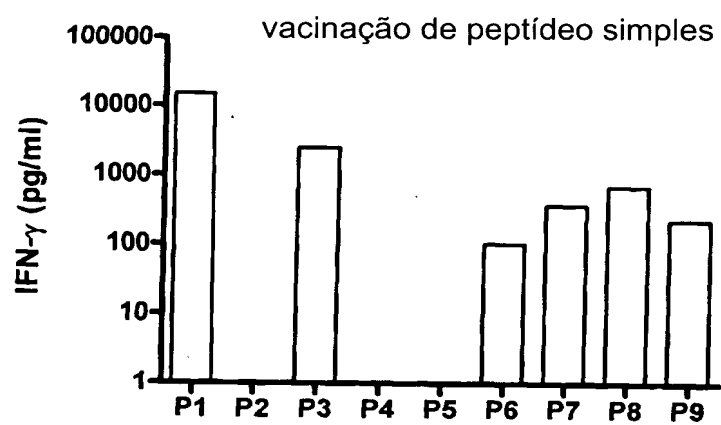


FIG. 6

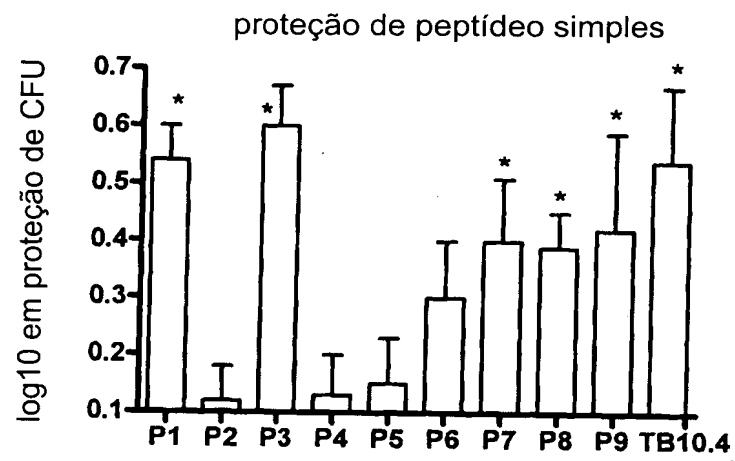


FIG. 7

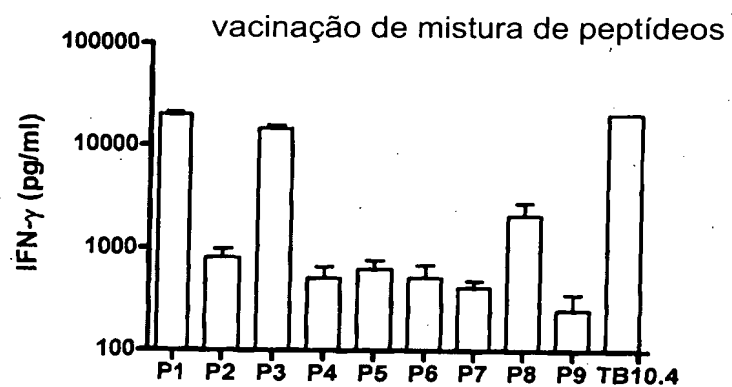


FIG. 8

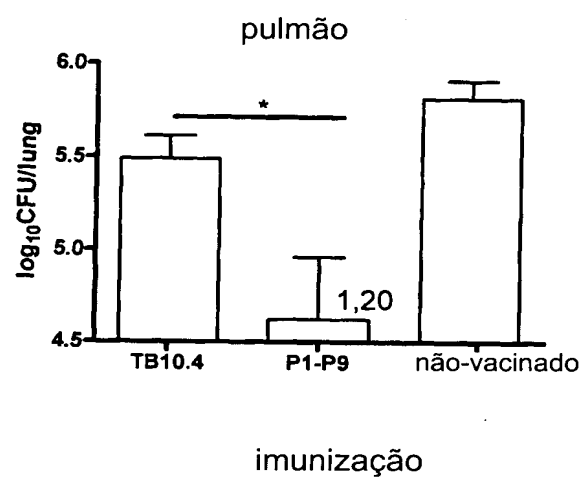


FIG. 9

CT521 : MAFPTPTPTKQKGFAGLSKGAFFVDFEFGQTLERGHITSRQIEACVAINRILAKGNWIRVFDKSVTKKPAETRKGKGAFDHWWVRGILLFVANVSKDAQALLERAAKKGIRTFVVERV

CT521-P1: MAFPTPTPTKQKGFAGLSK
 CT521-P2: KQFAGLSKGAFFVDFEFGQT
 CT521-P3: VDFEFGQTLERGHITSRQIEA
 CT521-P4: GHTSRQIEACVAINRILAKG
 CT521-P5: AINRILAKGNWIRVFDKSVT
 CT521-P6: IRVFDKSVTKKPAETRKGKGA
 CT521-P7: KPAETRKGKGAFDHWWVRP
 CT521-P8: FDHWWVRGILLFVANVSK
 CT521-P9: ILLFVANVSKDAQALLERAAK
 CT521-P10: DALRRAAKUGIRTFVVERV

FIG. 10

FIG. 11

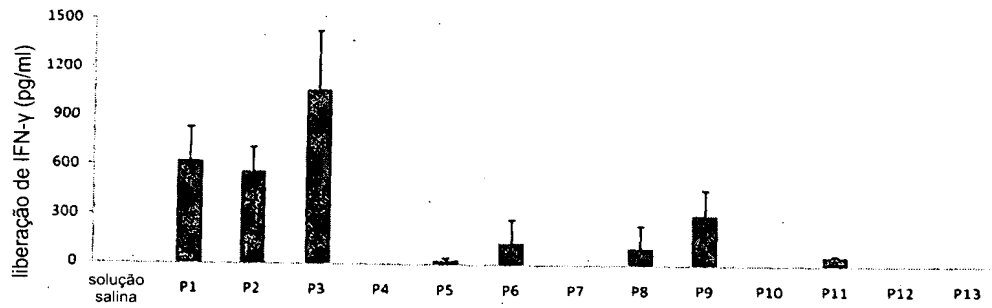
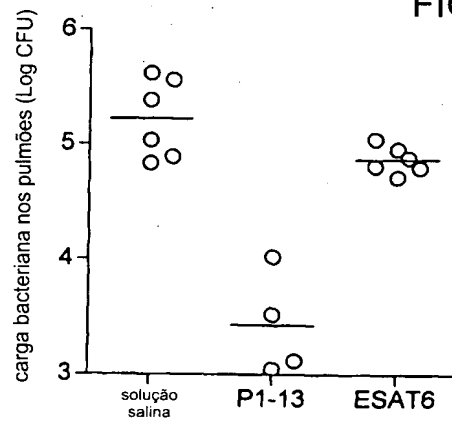


FIG. 12



RESUMO

Patente de Invenção: **"EXPANSÃO DO REPERTÓRIO DE CÉLULAS T PARA INCLUIR EPÍTOPOS SUBDOMINANTES ATRAVÉS DA VACINAÇÃO COM ANTÍGENOS LIBERADOS COMO FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS OU COQUETÉIS DE PEPTÍDEO"**.

A presente invenção refere-se a uma forma conveniente de induzir um reconhecimento amplo de respostas dominantes e subdominantes para epítomos de qualquer antígeno importante para profilaxia ou tratamento de uma doença crônica, através da imunização com conjuntos de fragmentos sobrepostos (peptídeos sintéticos, por exemplo 10 a 30 mers com 2 a 20 aa sobrepostos) do antígeno desejado em adjuvantes apropriados. O repertório de células T é preparado para incluir não apenas o epítomo imunodominante reconhecido quando a molécula intacta é usada para imunização e induzida pela própria infecção crônica, mas para induzir uma resposta muito mais ampla e balanceada para vários epítomos subdominantes. A resposta de células T resultante para epítomos subdominantes é importante para proteção contra doenças crônicas que por si só induzem a respostas focadas apenas para epítomos imunodominantes. A grande vantagem da presente invenção é que ela não requer conhecimento prévio sobre a localização e identidade precisas dos epítomos subdominantes e seu reconhecimento em uma população humana, mas expande o repertório de células T, e através dele o número total de epítomos reconhecidos pelas células T específicas preparadas através da vacinação a partir de poucos epítomos imunodominantes até muitos epítomos de vacina relevante. Para doenças crônicas controladas por imunidade humoral, a resposta de células de T-helper preparadas pela mistura de peptídeos pode, convenientemente, também ser reforçada por proteínas inteiras para máxima indução da resposta do anticorpo.