

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

| | | |
|--|---|-----------|
| (22) Data de pedido: 2005.12.23 | (73) Titular(es): VAXON BIOTECH | |
| (30) Prioridade(s): | GENOPOLE 2 RUE GASTON CRÉMIEUX 91057 | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2008.09.03 | EVRY CEDEX | FR |
| (45) Data e BPI da concessão: 2009.07.08 199/2009 | (72) Inventor(es): KONSTANTINOS KOSMATOPOULOS | FR |
| | SÉBASTIEN CORNET | FR |
| | (74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO | |
| | R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA | PT |

(54) Epígrafe: **POLIPÉPTIDO IMUNOGÉNICO FORMADO POR PÉPTIDOS CRÍPTICOS
OPTIMIZADOS PROVENIENTES DE ANTIGÉNIOS TUMORAIS, E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"POLIPÉPTIDO IMUNOGÉNICO FORMADO POR PÉPTIDOS CRÍPTICOS OPTIMIZADOS PROVENIENTES DE ANTIGÉNIOS TUMORAIS, E SUAS UTILIZAÇÕES"

A presente invenção diz respeito à área de vacinas contra o cancro. Mais especialmente, a presente invenção refere-se a um polipéptido otimizado para utilizar em uma vacina contra o cancro, que inclui três péptidos crípticos tumorais com imunogenicidade intensificada.

A identificação recente de antigénios associados a tumores atingidos como alvo ("targeted") pela acção de linfócitos T citotóxicos antitumorais [(CTL) Cytotoxic T lymphocytes] abriu o caminho a tratamentos com vacinas contra o cancro que visam a estimulação do repertório de CTLs específicos de tumores.

As vacinas antitumorais experimentais assumem várias formas, incluindo péptidos livres, células dendríticas carregadas com péptidos ou lisados tumorais, e DNA [deoxyribonucleic acido (ácido desoxirribonucleico)]. Apesar das vacinas baseadas em péptidos serem muito mais atractivas do que outras formas no que respeita a exequibilidade, muitos estudos, com péptidos tumorais dominantes revelaram eliciar apenas respostas imunológicas e clínicas fracas, com acentuada variação entre doentes (Rosenberg et al., 2004). Alguns factores podem explicar esses resultados relativamente decepcionantes. Primeiro, a maioria dos antigénios tumorais são proteínas próprias ("self") não mutadas que os tecidos normais também expressam, incluindo o timo. Isso levanta questões de tolerância do repertório de CTLs específicos de

tumores (Restifo, 2001; Van Pel et al., 1995), o que permite péptidos dominantes em vez de péptidos crípticos (Cibotti et al., 1992; Nanda e Sercarz, 1995; Restifo, 2001). De facto, demonstrou-se recentemente que os péptidos crípticos induziam imunidade antitumoral mais eficientemente do que os péptidos dominantes (Gross et al., 2004).

Segundo, abordagens com base em epitopos individuais induzem uma resposta de CTLs restringida aos HLA [Human leucocyte antigen (Antigénio Leucocitário Humano)] contra apenas um antigénio que, devido à instabilidade genética dos tumores, pode não ser expresso por todas as células tumorais (Brasseur et al., 1995; Lehmann et al., 1995). Tentativas que provocam respostas de CTLs a múltiplos antigénios apresentarão algumas possíveis vantagens. Em particular, a expressão de pelo menos um antigénio-alvo deve ser suficiente para disparar a citotoxicidade, e improvavelmente ocorrer simultaneamente nas células tumorais a perda de todos os antigénios-alvo, especialmente quando os antigénios em questão são essenciais para a sobrevivência das células e o crescimento dos tumores. Essa abordagem pode provocar acentuadas respostas imunitárias (Ouika et al., 1996).

Finalmente, uma imunoterapia do cancro de amplo espectro deve direccionar-se para (target) antigénios tumorais universais, como TERT, HER-2/neu, MUC-1 e MAGE-A, que são superexpressos por uma grande diversidade de tumores (MINEV et al., 2000; Ofuji et al., 1998; Ogata et al., 1992; Reese e Slamon, 1997; Slamon et al., 1987; Van den Eynde e Van den Bruggen, 1997; Vonderhelde et al., 1999). A maioria desses antigénios participa na sobrevivência das células tumorais e na tumorigenicidade, e a sua regulação negativa ("down-

-regulation") para escapar à resposta imunitária pode consequentemente gerar um efeito nocivo sobre o crescimento tumoral.

A fim de responder pelo menos a parte das questões mencionadas antes, os inventores reuniram três péptidos crípticos universais otimizados derivados de antigénios tumorais (TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} e MAGE-A_{248V9}) em alguns polipéptidos com 28 aminoácidos, e calcularam a capacidade dos polipéptidos obtidos para induzir uma resposta imunitária contra todos os três péptidos simultaneamente, quer *in vivo* em murganhos HLA-A*0201 transgénicos (HHD) quer *in vitro* em dadores humanos saudáveis. Previamente tinha-se demonstrado a capacidade de cada um dos três péptidos provocar uma resposta antitumoral *in vivo* e *in vitro* (Gross et al., 2004; Scardino et al., 2002). Curiosamente, CTLs elicitados por MAGE-A_{248V9} atingiram como alvo (targeted) todos os antigénios MAGE-A (-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, -A12) (Graff-Dubois et al., 2002).

Como descrito a seguir, os inventores demonstraram que a) um polipéptido constituído por TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} e MAGE-A_{248V9} elicita uma resposta de CTLs poli(específica), em desacordo com uma mistura simples dos três péptidos; b) a capacidade do polipéptido para induzir uma resposta de CTLs poli(específica) depende da sua organização interna: entre as seis variantes que correspondem a todos os possíveis arranjos dos três péptidos, apenas uma produziu uma resposta de CTLs triespecífica em quase todas as experiências com células murinas e humanas.

Um primeiro objectivo da presente invenção é, consequentemente, um polipéptido que compreende a sequência

YLQVNSLQTVX₁X₂X₃YLEYRQVPVX₁X₂X₃YLEEITGYL (SEQ ID No:1). Nessa sequência, os epitopos TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} e MAGE-A_{248V9} estão separados pelos espaçadores X₁X₂X₃, em que X₁, X₂ e X₃ representam um qualquer aminoácido ou nenhum. Conseqüentemente o polipéptido tem de comprimento pelo menos 28 aminoácidos; o seu comprimento pode aumentar mediante a adição de espaçadores entre os epitopos, e/ou mediante a adição de sinais, nas suas extremidades N-terminal e/ou C-terminal, que favorecem o seu processamento. Em particular, o polipéptido de acordo com a presente invenção pode incluir ainda uma sequência de sinal para translocação através do retículo endoplasmático e a sua extremidade N-terminal. Algumas sequências de sinal para translocação através do retículo endoplasmático têm sido descritas em documentos científicos e podem utilizar-se no contexto da presente invenção. Por exemplo, a sequência de sinal cadeias kappa de Ig (Ishioka et al., 1999), e a sequência de sinal proteína E3/19-kD (Anderson et al., 1991) podem acrescentar-se à extremidade N-terminal dos péptidos de acordo com a presente invenção. Alternativamente ou além disto, o polipéptido de acordo com a presente invenção pode ainda incluir ubiquitina na sua extremidade C-terminal, tendo em vista que a ubiquitinação de proteínas resulta no aumento da proteólise.

Em uma forma de realização preferida do polipéptido de acordo com a presente invenção, X₁=X₂=X₃=nenhum. Isso significa que os três epitopos estão directamente ligados uns aos outros. Na ausência de ubiquitina e do sinal para translocação através do retículo endoplasmático, o polipéptido é conseqüentemente o polipéptido Poli-6 ilustrado nos exemplos seguintes, a sequência do qual é YLQVNSLQTVYLEYRQVPVYLEEITGYL (SEQ ID No: 2).

De acordo com uma outra forma de realização, os espaçadores entre os epitopos são AAY, o que significa que $X_1=X_2=A$ e $X_3=Y$.

Nos polipéptidos de acordo com a presente invenção, os aminoácidos podem ser L- ou D-aminoácidos.

Um polipéptido de acordo com a presente invenção exhibe preferivelmente uma ou ambas as propriedades seguintes, que representam indicadores de excelente imunogenicidade:

induz uma resposta trispécífica de células T CD8+ contra TERT_{988Y}, MAGE-A_{248V9}, e HER-2/neu_{402Y}, em uma maioria de murganhos HHD vacinados com o referido polipéptido;

induz uma resposta trispécífica de células T CD8+ contra TERT_{988Y}, MAGE-A_{248V9} e HER-2/neu_{402Y} em um ensaio *in vitro* com PBMCs humanas provenientes de doadores HLA-A*0201 saudáveis; essa resposta trispécífica obtém-se preferivelmente com PBMCs provenientes de uma maioria, mais preferivelmente pelo menos 70%, de doadores HLA-A*0201 saudáveis.

Um perito na especialidade pode verificar facilmente essas propriedades, utilizando os protocolos e ensaios descritos na parte experimental que se segue.

Um outro objectivo da presente invenção consiste em uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido como descrito antes. Em uma forma de realização preferida, a molécula de ácido nucleico representa um vector de expressão. Por "vector de expressão" entende-se uma molécula que, quando introduzida em uma célula de um mamífero, permite a expressão

do referido polipéptido codificado. Para esse objectivo, qualquer perito na especialidade pode escolher um promotor de transcrição apropriado [por exemplo, o promotor de citomegalovírus (CMV)], uma sequência codificante com códons otimizados para expressão em células humanas, uma sequência apropriada para terminação da tradução, eventualmente uma sequência consenso de Kozak, etc..A molécula de ácido nucleico é preferivelmente uma molécula de ADN.

Um terceiro objectivo da presente invenção consta de uma célula dendrítica isolada carregada com um péptido como descrito antes, ou transduzida com uma molécula de ácido nucleico que codifica esse polipéptido. No presente contexto "isolada" significa que a referida célula dendrítica não se encontra no organismo do doente. Preferivelmente a célula é carregada ou transduzida *ex vivo*. Por exemplo, a célula dendrítica pode carregar-se com o polipéptido utilizando a técnica descrita por Vonderheide et al., (Vonderheide et al., 2004) ou transduzir-se com um vector de expressão utilizando o protocolo descrito por Firat et al. (Firat et al., 2002).

A presente invenção refere-se igualmente a um complexo que compreende um vector de libertação de péptidos e um polipéptido como descrito antes. Exemplos de vectores de libertação de péptidos que se podem utilizar de acordo com a presente invenção são péptidos capazes de penetrarem as células, toxinas bacterianas como a adenilato-ciclase de *B. pertussis* (Fayolle et al., 1999), a toxina da difteria (Fayolle et al., 1999), a toxina do antraz (Doling et al., 1999), a subunidade B da toxina Shiga (Halcheur et al., 2000) e outros vectores como a toxina PLA2 [phospholipase A2 (fosfolipase A2)] isolada do veneno de abelha (Babon et al.,

2005), lipossomas, virossomas (Bungener et al., 2002) e similares.

Um outro tipo de complexo de acordo com a presente invenção compreende um vector de libertação de genes e uma molécula de ácidos nucleicos como descrita antes. Até agora descreveu-se uma grande variedade de vectores de libertação de genes, entre os quais qualquer perito na especialidade faz depender a escolha da via de administração considerada (ex vivo, intra-tumoral, sistémica,...), do tipo de células-alvo, etc.. Exemplos não limitativos de vectores de libertação de genes que se podem utilizar de acordo com a presente invenção são vectores não virais como lipossomas, péptidos capazes de penetrarem nas células, nanopartículas (como as partículas de ouro para administração pela técnica "gene gun"), bactérias (Vassaux et al., 2005) e vectores virais como MVA (Meseda et al., 2005), adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, lentivirus e similares, os quais são exuberantemente descritos na literatura científica.

A presente invenção diz igualmente respeito a uma composição farmacêutica que compreende um polipéptido e/ou uma molécula de ácido nucleico e/ou um complexo e/ou células dendríticas obtidas através de técnicas de engenharia genética como descrito antes. Em particular, podem utilizar-se polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, complexos e células dendríticas de acordo com a presente invenção na preparação de uma composição imunogénica destinada a imunoterapia anticancro. Essas composições são especialmente úteis para imunoterapia de tumores que expressam pelo menos um antigénio escolhido no grupo constituído pela família MAGE-A, família HER e TERT, especialmente para o tratamento de indivíduos HLA-A*0201.

Vacinação contra o cancro ou processos de tratamento, que compreendem uma fase de administração de um polipéptido e/ou de uma molécula de ácido nucleico e/ou de um complexo de acordo com a presente invenção, quer *in vivo* a um doente necessitado da mesma, quer *ex vivo* em células originadas no referido doente, fazem igualmente parte da presente invenção, bem como vacinação ou processos de tratamento que compreendem uma fase de administração a um indivíduo de células dendríticas obtidas através de técnicas de engenharia genética como descrito antes.

A presente invenção ilustra-se ainda através da figura e exemplos seguintes.

LEGENDA DA FIGURA

Figura 1: Reconhecimento dos péptidos nativos cognatos (aparentados) por CTLs murinos induzidos por péptidos crípticos otimizados.

As linhas de CTLs eram provenientes de esplenócitos de murganhos HHD imunizados contra péptidos crípticos otimizados, como descrito em Materiais e Processos, as linhas de CTLs foram analisadas quanto à citotoxicidade contra alvos RMA5/HHD carregados com um péptido irrelevante (HIVgag76) ou com o péptido nativo cognato, em uma proporção de linfócitos para células alvo de 10/1.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Materiais e Processos

1.1. Animais

Murganhos HLA-A*0201 transgênicos HHD foram descritos em outros trabalhos (Pascolo et al., 1997).

1.2. Células

Células RMA/SH-213 murinas foram descritas em outros trabalhos (Pascolo et al., 1997). Células T2 de tumores humanos que expressam HLA-A*0201 são deficientes em TAP1/2. Todas as células cresceram em meio RPMI 1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal de vitela (FCS).

1.3. Péptidos

Os péptidos foram sintetizados por Epytop (Nimes, France)

1.4. Determinação da afinidade relativa e da estabilidade do complexo péptido/HLA-A*0201

O protocolo utilizado para avaliar a afinidade relativa (RA) está descrito detalhadamente em outros trabalhos (Tourdot et al., 2000). Rapidamente, incubaram-se células T2 com diversas concentrações de péptidos (0,1 a 100 μ M) durante 16 horas e marcaram-se seguidamente com mAb BB7.2 para quantificar a expressão dos HLA-A*0201. Para cada concentração de cada um dos péptidos, calculou-se a marcação específica dos HLA-A*0201 sob a forma de percentagem da

marcação obtida com o péptido de referência HIVpol589 (IVGAETFYV) utilizado a 100 μ M. A afinidade relativa calculou-se como a concentração do péptido em ensaio dividida pela concentração do péptido de referência que induziu a expressão dos HLA-A*0201 em 20%. Para determinar a estabilidade do complexo péptido/HLA-A*0201, incubaram-se células T2 durante a noite com cada um dos péptidos na concentração de 100 μ M e à temperatura de 37 °C. Seguidamente trataram-se as células com Brefeldin A durante 1 hora, lavaram-se, incubaram-se à temperatura de 37 °C durante 0, 2, 4 e 6 horas, e marcaram-se com mAb BB7.2. Definiu-se DC₅₀ como o tempo necessário para perder 50% dos HLA-A*0201, como previamente descrito (Tourdot et al., 2000).

1.5.Geração de CTLs em murganhos HHD

Injectaram-se murganhos HHD subcutaneamente com 100 μ g de péptidos nonâmeros/decâmeros, e com 240 μ g de polipéptido emulsionado em adjuvante de Freund's incompleto (IFA) mais 150 μ g de epitopo T helper HBVcore128 restringido a I-Ab (epitopo a que se apresentam células T helper via o espaçador HBV_{core128} restringido a I-A^b). Onze dias mais tarde estimularam-se *in vitro* células de baço (5×10^7 células em 10 ml) provenientes de murganhos imunizados com péptido (10 μ M) em RPMI 1640 + 10% de FCS durante cinco dias. As linhas de CTLs foram estabelecidas por reestimulação semanal *in vitro* com células de baço irradiadas na presença de reduzidas concentrações peptídicas (1 a 0,1 μ M) e de 50 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, CA).

1.6. Ensaio de citotoxicidade

Como alvos utilizaram-se células RMA/SH-2 murinas, como descrito em outros trabalhos (Tourdot et al., 1997). Rapidamente, alvos marcados com $2,5 \times 10^3$ de ^{51}Cr foram pulsados por péptidos durante 60 minutos à temperatura de 37°C . Seguidamente adicionaram-se células efectoras em $100\ \mu\text{l}$ de meio e incubaram-se durante 4 horas à temperatura de 37°C . Concluída a incubação, recolheram-se $100\ \mu\text{l}$ de sobrenadante e determinou-se a radioactividade em um contador para medir radiação γ . A percentagem de lise específica determinou-se tal como:
$$\text{Lise} = \frac{\text{Libertação Experimental} - \text{Libertação Espontânea}}{\text{Libertação Máxima} - \text{Libertação Espontânea}} \times 100.$$

1.7. Análise de Imunofluorescência por citometria de fluxo

Para a marcação de tetrâmeros, coraram-se células provenientes de gânglios linfáticos [LN (lymph nodes)] para-aórticos e inguinais de murganhos imunizados com $15\ \mu\text{g/ml}$ dos tetrâmeros HLA-A2/TERT_{988Y} acoplado a PE, HLA-A2/MAGE-A_{248V9} e HLA-A2/HER-2/neu_{402Y} (Proimmune, Oxford, UK) na presença de um anticorpo receptor anti-Fc (clone 2.4 G2) em $20\ \mu\text{l}$ de PBS, 2% de FCS durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se as células uma vez com PBS, 2% de FCS e coraram-se seguidamente com anti-CD44-FITC (clone 1M.178), anti-TCR β -cromóforo (clone H57) e anti-CD8 α -APC (clone 53.6.7) (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) em $50\ \mu\text{l}$ de PBS, 2% de FCS durante 30 minutos à temperatura de 4°C . Seguidamente lavaram-se as células uma vez com PBS, 2% de FCS e analisaram-se imediatamente em um citómetro de fluxo FACSCalibur[®] (Becton Dickinson, San José, CA, USA).

1.8. Geração de células CD8 provenientes de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Por leucaferese recolheram-se PBMCs provenientes de voluntários HLA-A*0201 saudáveis. Produziram-se células dendríticas (DC) provenientes de células aderentes (2×10^6 células/ml) cultivadas durante sete dias com 500 UI/ml de GM-CSF (Leucomax, Schering-Plough, Kenilworth, NJ) e 500 UI/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro AB humano inativado pelo calor, 2 μ M de L-glutamina e antibióticos). No 7º dia, DCs foram pulsadas por 10 μ M de péptidos ou de polipéptidos durante 2 horas; adicionaram-se à cultura os agentes de maturação Poli I:C (Sigma, Oakville, Canada) a 100 ng/ml, e mAb anti-CD40 (clone G28-5, ATCC, Manassas, VA) a 2 μ g/ml e incubaram-se ainda DCs à temperatura de 37 °C durante a noite ou durante até 48 horas. Irradiaram-se seguidamente as DCs maduras (3500 rads). Purificaram-se células CD8⁺ por selecção positiva com MicroBeads CD8 (Miltenyl Biotec, Auburn, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Em placas de 96 cavidades e de fundo redondo estimularam-se células CD8⁺ (2×10^5) + células CD8⁻ (6×10^4) com 2×10^4 de DCs pulsadas por péptidos em meio de cultura completo suplementado com 1000 UI/ml de IL-6 e 5 UI/ml de IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN). A partir do 7º dia, estimularam-se novamente as culturas semanalmente com DCs carregadas de péptidos na presença de 20 UI/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, CA) e 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Após a terceira estimulação, examinaram-se células CD8 em um ensaio de libertação de IFN- γ .

1.9. Marcação intracelular do IFN- γ

Incubaram-se células T (10^5) com 2×10^5 de células T2 carregadas com o péptido estimulador na presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de Brefeldin-A (Sigma, Oakville, Canada). Seis horas mais tarde lavaram-se, coraram-se com anticorpo anti-CD8 conjugado com r-ficoeritrina (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) em PBS durante 25 minutos à temperatura de 4 °C, lavaram-se novamente, e fixaram-se com PFAa 4%. Permeabilizaram-se seguidamente as células com PBS, 0,5% de BSA, 0,2% de saponina (Sigma, Oakville, Canada), e marcaram-se com um mAb anti-IFN γ conjugado com alophycocianina (PharMingen, Mississauga, Canada) durante 25 minutos à temperatura de 4 °C antes da análise com um citómetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Exemplo 2: Imunogenicidade dos péptidos utilizados para gerar o polipéptido

Seleccionaram-se três péptidos para serem incluídos no polipéptido. HER-2/neu_{402Y} e TERT_{988Y} são as variantes optimizadas dos péptidos crípticos de baixa afinidade para HLA-A*0201 HER-2/neu₄₀₂ e TERT₉₈₈, eles próprios derivados dos antigénios tumorais exuberantemente expressos HER-2/neu e TERT (Scardino et al., 2002). Diferem dos péptidos nativos na posição 1, onde o resíduo nativo é substituído por um Y. Essa substituição potencia a afinidade dos péptidos crípticos restringidos aos HLA-A*0201 (Tourdot et al., 2000). O MAGE-A_{248V9} representa a variante optimizada do MAGE-A_{248D9/G9} que é comum a todas as moléculas MAGE-A. Difere dos péptidos nativos na posição 9, onde os aminoácidos D/G são substituídos pelo resto âncora primário V. Essa substituição potencia também a afinidade pelos HLA-A*0201 (Graff-Dubois et al., 2002).

Todos os três péptidos exibiram elevada afinidade de ligação pelos HLA-A*0201 (RA<5) e formaram complexos HLA/péptidos estáveis (DC₅₀>2h) (Graff-Dubois et al., 2002; Scardino et al., 2002) (Quadro 1). Como previamente revelado, todos os três péptidos mostraram-se imunogénicos em murganhos HLA-A*0201 transgénicos HHD (Graff-Dubois et al., 2002; Scardino et al., 2002). Mais essencialmente, linhas de CTLs murinas reconheceram especificamente e mataram alvos RMA5/HHD carregados com o péptido nativo apropriado (Figura 1).

Quadro 1. Afinidade pelos HLA-A*0201 dos péptidos MAGE-A_{248V9}, HER-2/neu_{402Y}, e TERT_{988Y}. ¹RA=Afinidade Relativa; concentração do péptido experimental/concentração do péptido de referência que induziu 20% da expressão dos HLA-A*0201 obtida com 100 µM do péptido referência. Afinidade do péptido de referência=1. ²DC₅₀: Dissociação do complexo 50: semivida do complexo HLA/péptidos (h)

| Péptido | Sequência | RA ¹ | DC ₅₀ ² |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| TERT _{988Y} | YYYYYLQVNSLQTV (SEQ ID No: 8) | 2,1 | >6 |
| HER-2/neu _{402Y} | YLEEITGYL (SEQ ID No: 10) | 3,6 | 4 |
| MAGE-A _{248V9} | YLEYRQVPV (SEQ ID No: 9) | 1,8 | 4 |

Exemplo 3: Respostas imunitárias à mistura de péptidos

O modo mais simples de estimular uma resposta poliespecífica de CTLs *in vivo* seria injectar uma mistura dos péptidos relevantes. Consequentemente, os inventores investigaram se murganhos HHD vacinados com uma mistura equimolar de péptidos HER-2/neu_{402Y}, TERT_{988Y} e MAGE-A_{248V9} apresentaram uma resposta poliespecífica *in vivo*. A resposta imunitária avaliou-se determinando a afluência de células T CD8 específicas dos péptidos nos gânglios linfáticos drenando o local da injeção sete dias depois da vacinação, utilizando

tetrâmeros específicos. Antes da utilização, validou-se cada um dos tetrâmeros com linhas de CTLs específicas dos péptidos como previamente descrito (Miconnet e tal., 2002). Uma resposta positiva registou-se quando a percentagem de células CD8 tetrâmero-positivas foi superior à percentagem média + 3 desvios padrão de células CD8 tetrâmero-positivas em seis murganhos naive (0,16% para MAGE-A_{248V9}, 0,13% para HER-2/-NEU_{402Y} e 0,16% para TERT_{988Y}). Vacinaram-se oito murganhos com a mistura de péptidos em duas experiências independentes (Quadro 2). Nenhum dos oito murganhos respondeu simultaneamente a todos os três péptidos. Três murganhos responderam a um péptido e cinco responderam a dois péptidos. As respostas a MAGE-A_{248V9} foram mais frequentes (6/8 murganhos) do que as respostas a HER-2/NEU_{402Y} (4/8 murganhos) ou a TERT_{988Y} (3/8 murganhos).

Quadro 2. Respostas de células T CD8 contra MAGE-A_{248V9}, HER-2/NEU_{402Y} e TERT_{988Y} em murganhos individuais imunizados com uma mistura equimolar de péptidos. "+": a percentagem de células T CD8 tetrâmero-positivas ocorreu entre uma e duas vezes o cutoff (ponto de terminação), como definido em Materiais e Processos (0,16% de) MAGE-A_{248V9}, 0,13% de HER-2/NEU_{402Y}, e 0,16% de TERT_{988Y}). "++": a percentagem de células T CD8 tetrâmero-positivas foi superior ao dobro do cutoff.

| Murganho | Resposta específica de T CD8 contra | | |
|----------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| | MAGE-A _{248V9} | HER-2/NEU _{402Y} | TERT _{988Y} |
| #1 | ++ | - | - |
| #2 | + | + | - |
| #3 | + | - | - |
| #4 | + | - | - |
| #5 | - | ++ | + |
| #6 | - | ++ | ++ |
| #7 | + | - | ++ |
| #8 | + | ++ | - |

A incapacidade da mistura de péptidos para estimular uma resposta tri-específica de células T CD8 confirmou-se *in vitro* com células humanas. As PBMCs provenientes de três dadores HLA-A*0201 estimularam-se *in vitro* com uma mistura de MAGE-A_{248V9}, HER-2/NEU_{402Y} e TERT_{988Y} e, após quatro ciclos de reestimulação, analisaram-se quanto à sua capacidade para reconhecer e serem activadas por células estimuladoras carregadas com cada um dos péptidos. A activação das PBMCs avaliou-se calculando a percentagem de células CD8 produtoras de IFN_γ utilizando a marcação (labeling) intracelular. Quando a percentagem de PBMCs activadas foi pelo menos o dobro da obtida com um péptido irrelevante registou-se uma resposta positiva. Nenhum dos três dadores desenvolveu uma resposta específica de células T CD8 contra todos os três péptidos (Quadro 3). O dador #D5725 respondeu a MAGE-A_{248V9}/HER-2/neu_{402Y}, o dador #D7241 respondeu a HER-2/neu_{402Y}, e o dador #D7225 respondeu a MAGE-A_{248V9}/TERT_{968Y}.

Quadro 3. Células T CD8 específicas de péptidos induzidas por estimulação de dadores saudáveis de PBMCs com a mistura de péptidos. As células T CD8 específicas de péptidos foram geradas por estimulação *in vitro* de PBMCs a partir de três dadores saudáveis com uma mistura equimolar de péptidos MAGE-A_{248V9}, HER-2/neu_{402Y} e TERT_{968Y}. A especificidade de células T CD8 induzidas avaliou-se determinando a % de células CD8 produtoras de IFN_γ após estimulação com células T2 carregadas com péptidos como descrito em Materiais e Processos. A negrito apresentam-se os valores superiores ao dobro do valor de controlo negativo, indicativos de uma resposta positiva.

| Dador de PBMCs | % de células CD8 produtoras de IFN _γ em resposta a | | | |
|----------------|---|---------------------------|----------------------|-------------|
| | MAGE-A _{248V9} | HER-2/neu _{402Y} | TERT _{968Y} | Irrelevante |
| D5725 | 0,29 | 0,33 | 0,09 | 0,09 |
| D7225 | 0,32 | 0,54 | 0,24 | 0,27 |
| D7241 | 2,84 | 0,36 | 1,21 | 0,22 |

Esses resultados demonstraram que a vacinação com uma mistura simples de péptidos imunogénicos não gerou uma resposta poliespecífica.

Exemplo 4: Imunogenicidade dos Polipéptidos

Os inventores examinaram seguidamente se a vacinação com polipéptidos compostos por MAGE-A_{248V9}, HER-2/NEU_{402Y} e TERT_{988Y} elicitou uma resposta trispécífica de células T CD8. Primeiro optimizou-se o polipéptido tomando em consideração o processamento de cada péptido na sua posição C-terminal e a geração de péptidos juncionais com elevada afinidade para HLA-A*0201. O processamento na posição C-terminal foi avaliado utilizando dois modelos previstos (predictive) "online" de separação proteossómica (NetChop: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>, PAMProc: <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kzi/>) (Kesmir et al., 2002; Kuttler et al., 2000; Nussbaum et al., 2001). Arbitrariamente considera-se processar um péptido se a sua separação for prevista por ambos os modelos. A afinidade dos novos péptidos juncionais avaliou-se utilizando o modelo previsto a partir de Bimas (BioInformatics & Molecular Analysis Section) (Parker et al., 1994). Seis variantes de polipéptidos, designadas Poli-1 a Poli-6, englobam todos os possíveis arranjos de péptidos (Quadro 4). Nos modelos previstos nenhuma das seis variantes foi associada à separação de todos os três péptidos (Quadro 5). Além disso, Poli-1, Poli-3, Poli-4, e Poli-5 geraram péptidos juncionais com elevados resultados previstos para a ligação ao HLA-A*0201 (Quadro 4). Um desses péptidos (YLYLQVNSL; Poli-1 e -3) correspondeu a um péptido próprio (self) derivado da região variável da cadeia longa de imunoglobulinas humanas.

Quadro 4: Análise in silico das seis possíveis variantes de polipéptidos: geração de péptidos juncionais previstos como tendo elevada afinidade pelo HLA-A*0201

| Polipéptido | Sequência | Sequência do epitopo juncional | Resultados de Bimas |
|--------------|---|--------------------------------|---------------------|
| Poli-1 M-N-T | YLEYRQVPV- YLEEITGYL-YLQVNSLQTV (SEQ ID No:3) | YLYLQVNSL (SEQ ID NO: 11) | 723.245 |
| Poli-2 M-T-N | YLEYRQVPV- YLQVNSLQTV-YLEEITGYL (SEQ ID No:4) | | |
| Poli-3 N-T-M | YLEEITGYL-YLQVNSLQTV -YLEYRQVPV (SEQ ID No:5) | YLYLQVNSLQ (SEQ ID NO: 12) | 723.245 |
| Poli-4 N-M-T | YLEEITGYL-YLEYRQVPV- YLQVNSLQTV (SEQ ID No:6) | YLYLEYRQV (SEQ ID NO: 13) | 307.142 |
| Poli-5 T-N-M | YLQVNSLQTV- YLEEITGYL-YLEYRQVPV (SEQ ID No:7) | YLYLEYRQV (SEQ ID NO: 14) | 307.142 |
| Poli-6 T-M-N | YLQVNSLQTV- YLEYRQVPV-YLEEITGYL (SEQ ID No:2) | | |

Quadro 5: Análise in silico das seis possíveis variantes de polipéptidos: previsão das posições de separação (cleavage) nos proteassomas das seis possíveis configurações de polipéptidos. a: Relativamente a Paproc. (|) simboliza uma escassa probabilidade de separação. b: Relativamente a Netchopp, o limiar foi estabelecido em 0,5 e a rede (network) utilizada foi: C-terminal 1.0. C-TERMINAL 2.0 E 20S''. c: Para considerar que um péptido se destina a ser processado foi necessária a previsão de separação em ambos os modelos

| | Algoritmo de previsão de separação | Sequência e sítio de separação (e ()) | Número de péptidos processados previstos ^c |
|--------|------------------------------------|---|---|
| Poli-1 | Paproc | YLEYRQV PVY L E EITGY L Y()L QV NSLQTV | 0 |
| | Netchopp | Y L EY RQVPVY L EEITGY L Y L QVNSL QTV | |
| Poli-2 | Paproc | YLEYRQV PVY L QV N()SLQT VYLE EITGYL | 0 |
| | Netchopp | Y L EY RQVPVY L QV NSL QT V Y LEEITGYL | |
| Poli-3 | Paproc | YLEEITGY L Y()L QV NSLQTV VYLE Y()RQVPV | 0 |
| | Netchopp | YLEEITGY L Y L QVNSL QTV Y L EY RQVPV | |
| Poli-4 | Paproc | YLEEITGY L YL EYRQV PVY L QV N()SLQTV | 0 |
| | Netchopp | YLEEITGY L Y L EYRQVPVY L QV NSL QTV | |
| Poli-5 | Paproc | YLQVNSLQTV VYLE EITGY L YL EYRQVPV | 0 |
| | Netchopp | Y L QV NSL QTV Y L EEITGY L Y L EYRQVPV | |
| Poli-6 | Paproc | YLQVNSLQTV VYLE Y()RQV PVY L E EITGYL | 0 |
| | Netchopp | Y L QV NSL QTV Y L EY RQVPVY L EEITGYL | |

Quando essa técnica prevista (predictive) falhou na identificação da variante polipeptídica com a mais elevada eficiência teórica, submeteram-se as variantes a ensaios experimentais no que respeita à sua capacidade para gerar uma resposta triespecífica de células T CD8 *in vivo* (murganhos HHD) e *in vitro* (dadores HLA-A*0201 saudáveis).

Vacinaram-se murganhos HHD com cada um dos polipéptidos, e, utilizando tetrâmeros específicos, identificaram-se, em gânglios linfáticos drenantes, células T CD8 específicas dos péptidos individuais. Todas as seis variantes polipeptídicas mostraram-se imunogénicas em murganhos HHD (isto é, geraram uma resposta contra pelo menos um péptido) mas a frequência de murganhos que responderam foi diversificada de uma variante para outra. As variantes mais imunogénicas foram Poli-1, Poli-3 e Poli-6, com 100%, 87% e 83% de murganhos que responderam, respectivamente (Quadro 6). Poli-2, Poli-4 e Poli-5 induziram uma resposta em respectivamente 57%, 62% e 62% de murganhos vacinados. A frequência de respostas acentuadas [a % de células CD8 tetrâmero-positivas pelo menos duplica o valor do "cutoff" (um limite ou ponto de terminação específico); designado ++] foi a mais elevada com Poli-6 (41% de todas as respostas), Poli-3 (30% de todas as respostas) e Poli-1 (25% de todas as respostas). As respostas foram dirigidas contra MAGE-A_{248V9} em 74% de murganhos que responderam, HER-2/neu_{402Y} em 71% e TERT_{988Y} em 55%. A análise das respostas imunitárias em murganhos individuais demonstrou que Poli-6 induziu uma resposta triespecífica em 67% de murganhos vacinados, seguido por Poli-4 (37,5%), Poli-1 (28,5%), Poli-5 (25%) e Poli-3 (12,5%). O Poli-2 não induziu resposta triespecífica em qualquer murganho.

| | Resposta específica de células T CD8 contra | | |
|--------|---|---------------------------|----------------------|
| | MAGE-A _{248V9} | HER-2/neu _{402Y} | TERT _{988Y} |
| Poli-1 | + | ++ | + |
| | - | + | - |
| | + | + | + |
| | + | - | - |
| | ++ | - | - |
| Poli-2 | - | + | + |
| | - | ++ | + |
| | - | + | - |
| | - | - | - |
| | + | - | - |
| Poli-3 | + | + | - |
| | - | + | - |
| | ++ | ++ | - |
| | ++ | - | - |
| | + | - | - |
| Poli-4 | - | - | + |
| | + | + | + |
| | - | - | + |
| | + | ++ | + |
| | - | - | - |
| Poli-5 | - | + | - |
| | + | + | + |
| | + | + | + |
| | + | + | - |
| | + | - | - |
| Poli-6 | + | ++ | + |
| | + | ++ | + |
| | + | + | + |
| | + | ++ | + |
| | - | - | - |
| | + | + | + |
| | + | + | - |
| ++ | ++ | ++ | |
| ++ | ++ | ++ | |
| ++ | ++ | ++ | |

Quadro 6: Resposta de células T CD8 contra MAGE-A_{248V9}, HER-2/neu_{402Y} e TERT_{988Y} em murganhos individuais imunizados com os diferentes polipeptídeos. A resposta imunitária avaliou-se calculando a % de células T CD8 tetrâmero-positivas nos gânglios linfáticos drenantes de murganhos vacinados. "-": percentagem de células T CD8 tetrâmero-positivas abaixo do cutoff, como definido em Materiais e Processo (0,16% para MAGE-A_{248V9}, 0,13% para HER-2/neu_{402Y}, e 0,16% para TERT_{988Y}). "+": percentagem uma a duas vezes o cutoff. "++": percentagem maior do que duas vezes o cutoff. As linhas sombreadas correspondem a murganhos que respondem a todos os três péptidos.

Esses resultados foram confirmados em células humanas *in vitro*. Ensaaiou-se cada um dos polipéptidos (excepto para Poli-2, que se mostrou muito fracamente imunogénico em murganhos HHD) com células provenientes de dois a cinco dadores saudáveis. Avaliaram-se as respostas imunitárias *in vitro* calculando a percentagem de células CD8 produtoras de IFN γ após activação peptídica específica. Todos os cinco polipéptidos estimularam células T para responderem a pelo menos um péptido em 80 a 100% de dadores. Contudo, apenas o Poli-6 e o Poli-1 induziram respostas triespecíficas dos CTL. O Poli-6 induziu respostas de todos os três péptidos em 80% de dadores, comparável a apenas 25% de dadores com Poli-1 (Quadro 7). O Poli-6 provocou também as respostas mais acentuadas (contra MAGE-A_{248V9} nos dadores #D7017 e #D7225; e contra HER-2/neu_{402Y} no dador #D7744)

| Polipéptido | Dador | Resposta específica de células T CD8 contra | | |
|-------------|-------|---|---------------------------|----------------------|
| | | MAGE-A _{248V9} | HER-2/neu _{402Y} | TERT _{988Y} |
| Poli-1 | D9442 | ++ | ++ | - |
| | D0204 | ++ | + | - |
| | D7131 | + | ++ | + |
| | D1100 | - | - | + |
| Poli-3 | D9242 | ++ | + | - |
| | D3031 | - | + | - |
| Poli-4 | D3031 | - | - | + |
| | D9242 | - | - | + |
| | D7131 | + | - | + |
| Poli-5 | D7771 | - | + | + |
| | D0204 | + | + | - |
| | D7017 | + | - | + |
| Poli-6 | D7744 | + | ++ | + |
| | D4212 | + | + | + |
| | D7017 | +++ | + | + |
| | D7225 | +++ | + | + |
| | D7601 | - | - | - |

QUADRO 7: Células T CD8 específicas dos péptidos induzidas por estimulação polipeptídica de PBMC de dadores humanos saudáveis. As células T CD8 específicas dos péptidos geraram-se por estimulação *in vitro* de PBMCs provenientes de dadores saudáveis com os diferentes polipéptidos. A especificidade das células T CD8 induzidas avaliou-se calculando a % das células CD8 produtoras de IFN γ após estimulação com células T2 carregadas com péptidos como descrito em Materiais e Processos. "-" % de células IFN γ -positivas duas vezes inferior à do controlo negativo (péptido irrelevante). "+" % de células IFN γ -positivas duas vezes superior à do controlo negativo. "++" % de células IFN γ -positivas 2 a 10 vezes superior à do controlo negativo. "+++" % de células IFN γ -positivas superior a dez vezes a do controlo negativo. As linhas sombreadas correspondem a células dadoras que respondem a todos os três péptidos.

Ao mesmo tempo, esses resultados mostraram que Poli-6 induziu frequentes e acentuadas respostas tri-específicas de células T CD8 quer *in vivo* (murganhos HHD) quer *in vitro* (PBMCs humanas).

DISCUSSÃO

Esse estudo de polipéptidos formados por três péptidos crípticos otimizados restringidos a HLA-A*0201 provenientes dos antígenos tumorais universais hTERT, HER-2/neu e MAGE-A identificou um polipéptido, denominado Poli-6 (SEQ ID No:2), que induziu uma resposta dos CTLs contra todos os três péptidos constituintes quer em murganhos transgênicos HHD que expressam HLA-A*0201 quer em células dadoras humanas saudáveis.

Há amplo consenso quanto à influência da organização polipeptídica (arranjo dos péptidos, adição de espaçadores), que deverá permitir de maneira ideal a separação correcta de todos os péptidos constituintes e evitar a criação de novos péptidos juncionais (junctional peptides) com elevada afinidade para a respectiva molécula do HLA. Alguns estudos demonstram que a presença de espaçadores entre os péptidos aumenta a eficiência da vacina através da promoção da separação dos péptidos individuais (Livingston et al., 2002; Velders et al., 2001; Wang et al., 2004). Além disso, Ishioka et al., observaram que a posição de um péptido no seio de um polipéptido pode influenciar a sua imunogenicidade. Isso realça a importância da configuração global do polipéptido (Ishioka et al., 1999). Os presentes resultados suportam esses achados, já que um dos seis arranjos polipeptídicos que foram ensaiados se apresentava altamente imunogénico, enquanto um outro se apresentava minimamente eficaz. Essa é a

primeira demonstração directa de que a organização polipeptídica deve ser melhorada a fim de se obter máxima imunogenicidade. Esses resultados mostram também que essa organização propícia não se pode antever utilizando modelos correntes previstos (predictive) de clivagem (cleavage) do proteassoma. De facto, não se previu que algum dos seis polipéptidos candidatos se separasse mais eficazmente do que os outros. Além disso, Poli-2, que falhou a capacidade de provocar uma resposta poliespecífica, não originou péptidos juncionais que se previu exibirem elevada afinidade para HLA-A*0201 (Antigénio HLA subtipo A*-0201) no modelo experimental utilizando Bimas (BioInformatics & Molecular Analysis Section).

Os inventores verificaram também que, quanto à capacidade de provocar uma resposta poliespecífica, a vacinação com uma mistura dos três péptidos foi muito menos eficiente do que a vacinação com polipéptidos. Curiosamente, células provenientes do dador humano D7225 responderam a todos os três péptidos após estimulação com Poli-6 *ex vivo*, mas ao HER-2/neu_{402Y} apenas após estimulação com a mistura de péptidos. A utilização de péptidos exógenos tem a desvantagem do total de complexos péptido/MHC I decair com uma cinética igual à da concentração dos péptidos exógenos (Wang et al., 2004). A curta semivida desses complexos conduziria a uma perda acentuada de eficiência na preparação (Gett et al., 2003). Em contraste, a apresentação cruzada de péptidos longos por APC poderia garantir uma fonte endógena de péptidos com cinética mais lenta e mais constante. Tem-se demonstrado que essa estratégia de péptidos longos é mais imunogénica do que a utilização dos correspondentes péptidos curtos (Zwaveling et al., 2002).

Como revelado antes, o polipéptido **Poli-6** de SEQ ID No: 2, que é formado por três péptidos tumorais crípticos otimizados provenientes de antigénios tumorais universais (HER-2/neu_{402Y}, TERT_{988Y} e MAGE-1A_{248V9}), induz uma resposta poliespecífica em murganhos HHD que expressam HLA-A*0201 e em células humanas *ex vivo*. Esse polipéptido apresenta potencialidade para vacinação de largo espectro contra tumores de doentes com cancro.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, K., Cresswell, P., Gammon, M., Hermes, J., Williamson, A. and Zweerink, H. (1991) Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med*, 174, 489-492.
- Babon, A., Almunia, C., Boccaccio, C., Beaumelia, B., Geib, M.H., Menez, A., Maillere, B., Abastado, J.P., Salcedo, M. and Gillet, D. (2005) Cross-presentation of a CMV pp65 epitope by human dendritic cells using bee venom P₁LA2 as a membrane-binding vector. *FEBS Lett*, 579, 1658-1664.
- Brasseur, F., Rimoldi, D., Lienard, D., Lethe, B., Carrol, S., Arishti, F., Suter, L., Vanwijck, R., Bourlond, A., Humblet, Y. and et al. (1995) Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*, 63, 375-380.
- Bungener, L., Idema, J., ter Veer, W., Huckriede, A., Daemen, T. and Wilschut, J. (2002) Virosomes in vaccine development: induction of cytotoxic T lymphocyte activity with virosome-encapsulated protein antigens. *J Liposome Res*, 12, 155-163.
- 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 U S A*, 89, 416-420.
- Dolling, A.M., Ballard, J.D., Shen, H., Krishna, K.M., Ahmed, R., Collier, R.J. and Starnbach, M.N. (1999) Cytotoxic T-lymphocyte epitopes fused to anthrax toxin induce protective antiviral immunity. *Infect Immun*, 67, 3290-3298.
- Fayolle, C., Ladant, D., Karimova, G., Uilmann, A. and Leclerc, C. (1999) Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol*, 162, 4157-4162.
- Firat, H., Zennou, V., Garcia-Pons, F., Ginhoux, F., Cochet, M., Danos, O., Lemonnier, F.A., Langlade-Demoyen, P. and Charnau, P. (2002) Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. Perspectives for immunotherapy. *J Gene Med*, 4, 38-45.
- Geft, A.V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. and Geginat, J. (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol*, 4, 355-360.
- Graff-Dubois, S., Faure, O., Gross, D.A., Alves, P., Scardino, A., Chouaib, S., Lemonnier, F.A. and Kosmatopoulos, K. (2002) Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*, 169, 575-580.

- Gross, D.A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Comet, S., Alves, P., Bennaceur-Griscelli, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., Lemonnier, F.A., Davoust, J., Miconnet, I., Vonderheide, R.H. and Kosmatopoulos, K. (2004) High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 113, 425-433.
- Halcheur, N., Bismuth, E., Bosset, S., Adotevi, O., Warnier, G., Lacabanne, V., Regnauld, A., Desaynard, C., Amigorena, S., Ricciardi-Castagnoli, P., Goud, B., Fridman, W.H., Johannes, L. and Tartour, E. (2000) The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol*, 165, 3301-3308.
- Ishioka, G.Y., Fikes, J., Hermanson, G., Livingston, B., Crimi, C., Qin, M., del Guercio, M.F., Oseroff, C., Dehnborg, C., Alexander, J., Chesnut, R.W. and Sette, A. (1999) Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigenic DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol*, 162, 3915-3925.
- Kasimir, C., Nussbaum, A.K., Schild, H., Detours, V. and Brunak, S. (2002) Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng*, 15, 287-296.
- Kuttler, C., Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Rammensee, H.G., Schild, H. and Haderl, K.P. (2000) An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol*, 298, 417-429.
- Lehmann, F., Marchand, M., Hainaut, P., Poullart, P., Sastre, X., Ikeda, H., Boon, T. and Couille, P.G. (1995) Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur J Immunol*, 25, 340-347.
- Livingston, B., Crimi, C., Newman, M., Higashimoto, Y., Appella, E., Sidney, J. and Sette, A. (2002) A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol*, 168, 5499-5508.
- Messida, C.A., Garcia, A.D., Kumar, A., Mayer, A.E., Manischewitz, J., King, L.R., Goding, H., Merchinsky, M. and Weir, J.F. (2005) Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology*, 339, 164-175.
- Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerellini, J.C. and Romero, P. (2002) CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol*, 168, 1212-1218.
- Mineev, B., Hipp, J., Firat, H., Schmidt, J.D., Langlade-Demoyen, P. and Zanetti, M. (2000) Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4796-4801.
- Nanda, N.K. and Sercarz, E.E. (1995) Induction of anti-self-immunity to cure cancer. *Cell*, 82, 13-17.
- Nussbaum, A.K., Kuttler, C., Haderl, K.P., Rammensee, H.G. and Schild, H. (2001) PAPProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*, 53, 87-94.
- Okuji, S., Ikeda, M., Tsujitani, S., Ikeguchi, M., Kaibara, N., Yuasa, I., Mitsuya, K., Kato, M. and Ito, H. (1998) Expression of MAGE-1, MAGE-2 and MAGE-3 genes in human gastric carcinomas; lack of evidence for cytotoxic effects in cases with simultaneous expression of MAGE-3 and HLA-A2. *Anticancer Res*, 18, 3639-3644.
- Ogata, S., Uehara, H., Chen, A. and Itzkowitz, S.H. (1992) Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. *Cancer Res*, 52, 5971-5978.
- Oukka, M., Manuguerra, J.C., Livadiotis, N., Tourdot, S., Riche, N., Vergnon, I., Cordopatis, P. and Kosmatopoulos, K. (1996) Protection against lethal viral infection by vaccination with nonimmunodominant peptides. *J Immunol*, 157, 3039-3045.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A. and 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.
- Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J.M., Smith, A.G., Lemonnier, F.A. and Perarnau, B. (1997) HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med*, 185, 2043-2051.
- Reese, D.M. and Slamon, D.J. (1997) HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells*, 15, 1-8.
- Restifo, N.P. (2001) Hierarchy, Tolerance, and Dominance in the Antitumor T-Cell Response. *J Immunother*, 24, 193-194.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C. and Restifo, N.P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 10, 909-915.
- 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., Vonderheide, R.H., Cardoso, A.A. and Kosmatopoulos, K. (2002) HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*, 168, 5900-5906.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-182.
- Tourdot, S., Oukka, M., Manuguerra, J.C., Magafa, V., Vergnon, I., Riche, N., Bruley-Rosset, M., Cordopatis, P. and Kosmatopoulos, K. (1997) Chimeric peptides: a new approach to enhancing the immunogenicity of peptides with low MHC class I affinity: application in antiviral vaccination. *J Immunol*, 159, 2391-2398.
- Tourdot, S., Scardino, A., Saïoustrou, 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.
- Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P. (1997) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, 9, 684-693.
- Van Pel, A., van der Bruggen, P., Coulie, P.G., Brichard, V.G., Lefhe, S., van den Eynde, B., Uytendaele, C., Renaud, J.C. and Boon, T. (1995) Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev*, 145, 229-250.
- Vassaux, G., Nitcheu, J., Jezzard, S. and Lemoine, N.R. (2005) Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol*, 206, 290-298.
- Velders, M.P., Weijzen, S., Eiben, G.L., Elmishad, A.G., Kloetzel, P.M., Higgins, T., Cioccarelli, R.B., Evans, M., Man, S., Smith, L. and Kast, W.M. (2001) Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*, 166, 5366-5373.
- Vonderheide, R.H., Domchek, S.M., Schultze, J.L., George, D.J., Hoar, K.M., Chen, D.Y., Stephens, K.F., Masutomi, K., Loda, M., Xia, Z., Anderson, K.S., Hahn, W.C. and Nadler, L.M. (2004) Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 10, 823-833.
- Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L. and Nadler, L.M. (1999) The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 10, 673-679.
- Wang, Q.M., Sun, S.H., Hu, Z.L., Zhou, F.J., Yin, M., Xiao, C.J. and Zhang, J.C. (2004) Epitope DNA vaccines against tuberculosis: spacers and ubiquitin modulates cellular immune responses elicited by epitope DNA vaccine. *Scand J Immunol*, 60, 219-225.
- Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Ofringa, R., van der Burg, S.H. and Melief, C.J. (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol*, 169, 350-356.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> VAXON BIOTECH

<120> IMMUNOGENIC POLYPEPTIDE COMPOSED OF TUMOR-ANTIGEN-DERIVED OPTIMIZED CRYPTIC PEPTIDES, AND USES THEREOF

<130> VMA/bv1788-2

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Poly-6 with spacers

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (23) .. (25)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 1

Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

Tyr Arg Gln Val Pro Val Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly
 20 25 30

Tyr Leu

<210> 2
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Poly-6

<400> 2

Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln
 1 5 10 15

Val Pro Val Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
 20 25

<210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Poly-1

<400> 3

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly
 1 5 10 15

Tyr Leu Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val
 20 25

<210> 4
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Poly-2

<400> 4

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu
 1 5 10 15

Gln Thr Val Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
 20 25

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Poly-3

<400> 5

Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu
 1 5 10 15

Gln Thr Val Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
 20 25

<210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Poly-4

<400> 6

Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val
 1 5 10 15

Pro Val Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val
 20 25

<210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Poly-5

<400> 7

Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Tyr Leu Glu Glu Ile Thr
 1 5 10 15

Gly Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
 20 25

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> TERT988Y

<400> 8

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

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

<220>
 <223> MAGE-A248V9

<400> 9

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
 1 5

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

<220>
 <223> HER-2/neu402Y

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HER-2/neu402Y

<400> 10

Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
<223> junctional epitope

<400> 11

Tyr Leu Tyr Leu Gln Val Asn Ser Leu
1 5

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

<220>
<223> junctional epitope

<400> 12

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

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> junctional epitope

<400> 13

Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val
1 5

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

<220>
<223> junctional epitope

<400> 14

Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val
1 5

Lisboa, 7 de Outubro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido caracterizado pelo facto de compreender a sequência YLQVNSLQTVX₁X₂X₃YLEYRQVPVX₁X₂X₃YLEEITGYL (SEQ ID NO: 1), na qual os epitopos TERT_{988Y} (SEQ ID NO: 8), MAGE-A_{248V9} (SEQ ID NO: 9), e HER-2/neu_{402Y} (SEQ ID NO: 10) são separados pelos espaçadores X₁X₂X₃, em que X₁, X₂ e X₃ representam ou qualquer aminoácido ou nenhum.
2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1., que compreende ainda uma sequência de sinal para translocação através do retículo endoplasmático ao nível da sua extremidade N-terminal.
3. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1. ou 2., que compreende ainda ubiquitina na sua extremidade C-terminal.
4. Polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 3., em que X₁=X₂=X₃=nenhum.
5. Polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 3., em que X₁=X₂=A e X₃=Y.
6. Polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 5., caracterizado pelo facto de induzir uma resposta triespecífica de células CD8+T dirigida contra TERT_{988Y}, MAGE-A_{248V9}, e HER-2/neu_{402Y} na maioria de murganhos HHD vacinados com o polipéptido mencionado.
7. Polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 6., caracterizado pelo facto de induzir uma resposta triespecífica de células CD8+T dirigida contra TERT_{988Y}, MAGE-A_{248V9}, e HER-2/neu_{402Y} em um ensaio *in vitro* com

PBMCs [(Peripheral blood mononuclear cells) Células mononucleares do sangue periférico] provenientes de dadores HLA-A*0201 saudáveis.

8. Polipéptido de acordo com a reivindicação 7., em que se obtém a mencionada resposta trispécífica de células CD8+T com PBMCs provenientes de uma maioria, de preferência de pelo menos 70%, de dadores HLA-A*0201 saudáveis.

9. Molécula de ácido nucleico que codifica um péptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8..

10. Molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 9., que é um vector de expressão.

11. Célula dendrítica isolada carregada com um polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., ou transduzida com uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 9. ou 10..

12. Complexo que compreende um vector de libertação de péptidos e um polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8..

13. Complexo que compreende um vector de libertação de genes e uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8. ou 9..

14. Composição farmacêutica que compreende um polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., e/ou uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 9. ou 10., e/ou uma célula dendrítica de acordo com a

reivindicação 11., e/ou um complexo de acordo com a reivindicação 12. ou 13..

15. Utilização de um polipéptido de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. a 8., e/ou de uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 9. ou 10., e/ou de uma célula dendrítica de acordo com a reivindicação 11., e/ou de um complexo de acordo com a reivindicação 12. ou 13., na preparação de uma composição imunogénica destinada a imunoterapia contra o cancro.

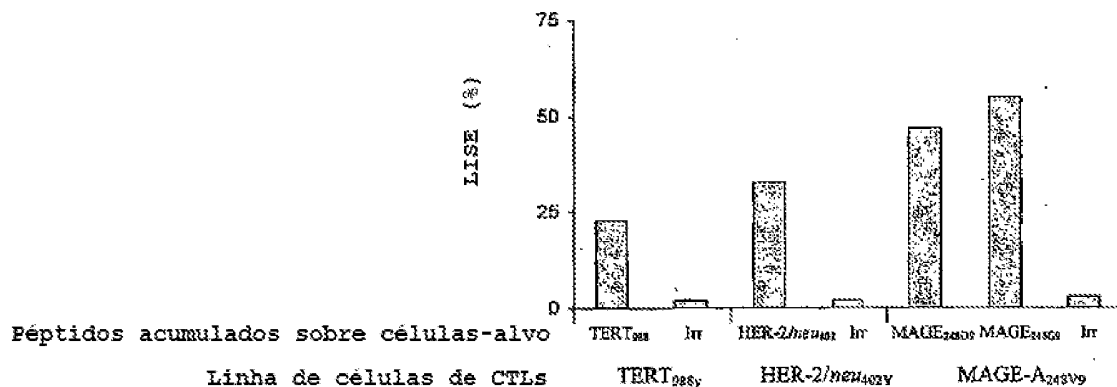
16. Utilização de acordo com a reivindicação 15., em que a citada composição se destina a imunoterapia de tumores que expressam pelo menos um antigénio escolhido no grupo constituído pela família MAGE-A, família HER e TERT.

17. Utilização de acordo com a reivindicação 15. ou 16., em que a citada composição se destina ao tratamento de indivíduos HLA-A*0201.

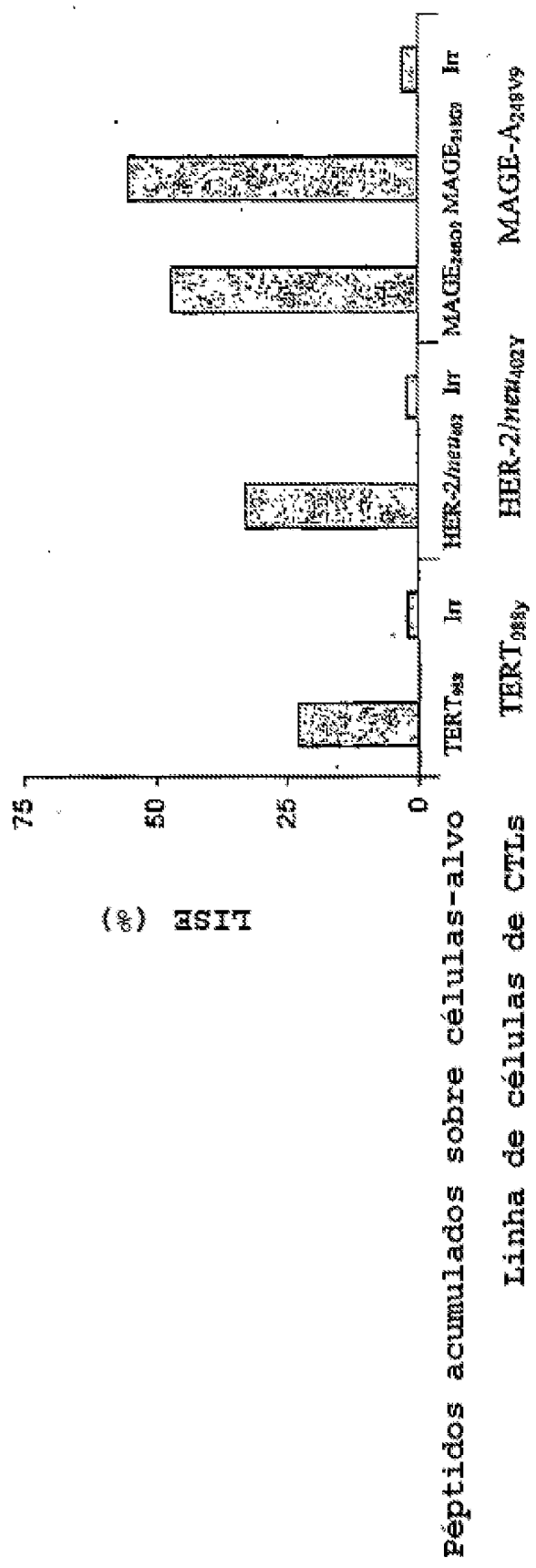
Lisboa, 7 de Outubro de 2009.

RESUMO

"POLIPÉPTIDO IMUNOGÉNICO FORMADO POR PÉPTIDOS CRÍPTICOS
OPTIMIZADOS PROVENIENTES DE ANTIGÉNIOS TUMORAIS, E SUAS
UTILIZAÇÕES"



A presente invenção diz respeito à área de vacinas contra o cancro. Mais especialmente, a presente invenção refere-se a um polipéptido otimizado, que inclui três péptidos crípticos tumorais com imunogenicidade intensificada e compreende a sequência de aminoácidos YLQVNSLQTVYLEYRQVPVYLEEITGYL, para utilizar em uma vacina contra o cancro. Os ácidos nucleicos que codificam esse polipéptido, bem como complexos e células dendríticas obtidas por técnicas de engenharia genética utilizando esse polipéptido ou um ácido nucleico que o codifica, fazem também parte da presente invenção.



Péptidos acumulados sobre células-alvo

Linha de células de CTLs

FIGURA 1