



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

(21) **PI0806463-6 A2**



* B R P I O 8 0 6 4 6 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/01/2008
(43) Data da Publicação: 06/09/2011
(RPI 2122)

(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/285
A61K 39/00
C07K 14/47

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, VACINA, USO DE UMA PROTEÍNA OU ÁCIDO NUCLEICO OU VETORES, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODO PARA TRATAR UM PACIENTE QUE SOFRE DE CÂNCER

(30) Prioridade Unionista: 15/01/2007 GB 0700760.2, 23/01/2007 GB 0701262.8

(73) Titular(es): Glaxosmithkline Biologicals S.A.

(72) Inventor(es): Dennis Martin, Normand Blais, Remi M. Palmantier

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008050290 de 11/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/087102de 24/07/2008

(57) Resumo: PROTEINA DE FUSÃO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, VACINA, USO DE UMA PROTEÍNA OU ÁCIDO NUCLEICO OU VETORES, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODO PARA TRATAR UM PACIENTE QUE SOFRE DE CÂNCER. A presente invenção diz respeito a proteínas de fusão que compreende um antígeno derivado do denominado antígeno de rejeição de tumor PRAME (também conhecido como DAGE) ligado a um parceiro de fusão imunológico que fornece epítopos auxiliares T, tais como, por exemplo, proteína D de Haemophilus influenzae B, proteínas parceiras de fusão que compreendem fragmentos de proteína D, métodos para preparar os mesmos e para formular vacinas e uso dos mesmos para o tratamento de uma variedade de cânceres.

“PROTEÍNA DE FUSÃO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, VACINA, USO DE UMA PROTEÍNA OU ÁCIDO NUCLEICO OU VETORES, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODO PARA TRATAR UM

5 PACIENTE QUE SOFRE DE CÂNCER”

A presente invenção diz respeito a proteínas de fusão que compreendem um antígeno derivado do denominado antígeno de rejeição de tumor PRAME (também conhecido como DAGE) ligado a um parceiro de fusão imunológica que fornece epítomos auxiliares T, tais como, por exemplo,

10 proteína D de *Haemophilus influenzae* B, métodos para a preparação dos mesmos e para formular vacinas e uso dos mesmos para tratar uma variedade de cânceres, que inclui, mas não limita-se a melanoma, mama, bexiga, câncer de pulmão, tal como NSCLC, sarcoma, câncer ovariano, câncer de cabeça e pescoço, câncer renal, carcinoma colorretal, mieloma múltiplo, leucemia

15 incluindo leucemia aguda e carcinoma esofágico.

Em uma outra forma de realização, a presente invenção diz respeito a proteínas parceiras de fusão que compreendem derivados de proteína D e métodos para a preparação dos mesmas.

Entre os grupos diferentes de antígenos associados com o

20 tumor, antígenos de testículos com câncer são de interesse para a imunoterapia por causa de sua expressão específica de tumor ampla e o fato que, no geral, estes antígenos não são expressados em células saudáveis. Mais do que 50 antígenos de câncer/testículos foram descritos até agora e, para muitos destes, os epítomos reconhecidos por linfócitos T foram identificados.

25 PRAME é um antígeno de testículo com câncer e está sob investigação como uma imunoterapia potencial.

Na imunoterapia, o antígeno cancerígeno é introduzido no paciente usualmente como uma vacina, por exemplo, contendo um antígeno como uma proteína ou um fragmento imunogênico do mesmo ou como

codificação de DNA para a proteína ou como um vetor contendo o dito DNA, que estimula o sistema imune do paciente a atacar tumores que expressam o mesmo antígeno.

Se a resposta apropriada for estimulada, os linfócitos T (células T) atacam os antígenos diretamente e fornecem controle da resposta imune. As células B e as células T que se desenvolvem são específicas para um tipo de antígeno. Quando o sistema imune é exposto a um antígeno diferente, as células B e células T diferentes são formadas. Quando os linfócitos desenvolvem-se, estes, normalmente, aprendem a reconhecer os tecidos do próprio corpo (de si mesmo) como diferentes de tecidos e partículas não encontrados normalmente no corpo (não de si mesmo). Uma vez que as células B e células T são formadas, algumas daquelas células multiplicarão e fornecerão “memória” para o sistema imune. Isto deixa o sistema imune responder de maneira mais rápida e mais eficiente ao período seguinte em que é exposto ao mesmo antígeno.

Certos experimentos buscam indicar que os antígenos de testículos com câncer podem estimular os mecanismos de memória no sistema imune.

É hipotetizado por alguns que o PRAME está envolvido na morte celular ou ciclos celulares. Este foi mostrado por alguns grupos ser expressado em melanoma em uma variedade de tumores incluindo pulmão, rim e cabeça e pescoço. De maneira interessante, este também parece ser expressado em 40 a 60% de leucemia, tal como leucemia linfóide aguda e leucemia mielóide aguda, ver, por exemplo, Exp Hematol. dezembro de 2000;28(12):1413-22. Em pacientes, foi observado que a super-expressão de PRAME parece estar associada com sobrevivência mais alta e taxas mais baixas de reincidência em comparação com aqueles que não expressam a proteína.

O antígeno e sua preparação são descritas na patente US N°

5.830.753. O PRAME é observado no Annotated Human Gene Database H-Inv DB sob os números de acesso: U65011.1, BC022008.1, AK129783.1, BC014974.2, CR608334.1, AF025440.1, CR591755.1, BC039731.1, CR623010.1, CR611321.1, CR618501.1, CR604772.1, CR456549.1 e
5 CR620272.1.

A proteína D é uma proteína de superfície da bactéria de gram-negativo, *Haemophilus influenza B*. A informação nos parceiros de fusão imunológica derivados da proteína D pode ser obtida a partir do WO 91/18926.

10 As proteínas de fusão de uma porção de um antígeno e um parceiro de fusão heterólogo são, algumas vezes, preparados para aumentar a imunogenicidade do antígeno e/ou produção auxiliar da proteína em quantidades e/ou pureza apropriadas, ver, por exemplo, o WO 99/40188 que descreve uma proteína de fusão de MAGE e, por exemplo, proteína D, por
15 exemplo, uma proteína de superfície da bactéria de gram-negativo, *Haemophilus influenza B*. A proteína de fusão é preparada de maneira recombinante e a sequência de secreção de proteína D pode ser incorporada na proteína de fusão para auxiliar potencialmente a secreção e a solubilização do produto final.

20 Breve Descrição das Figuras e Construções/Sequências

Figura 1	análise de SDS-page da Construção 3 e 4
Figura 2	análise de SDS-page da Construção 3a e 4a
Figura 3	resposta de CD4 (adjuvante AS01B)
Figura 4	resposta de CD8 (adjuvante AS01B - 20070499)
Figura 5	resposta de CD4 (adjuvante AS15)
Figura 6	resposta de CD8 (adjuvante AS15)
Figura 7	Uma sequência de aminoácido comercializada de exemplos de construções da presente invenção
Figura 8	Alinhamento entre LipoD-MAGE3-His (SEQ ID N°: 43) e pD1/3-PRAME-His (SEQ ID N°: 10)
Figura 9	Alinhamento entre a sequência dividida da proteína D original de <i>Haemophilus influenzae</i> (SEQ ID N°: 45) e o LipoD-MAGE3-His (SEQ ID N°: 43)
Figura 10	Alinhamento entre a sequência dividida da proteína D original de <i>Haemophilus influenzae</i> (SEQ ID N°: 41), o pD-MAGE3-His (SEQ ID N°: 45) e uma construção de pD1/3-PRAME-His que não inclui aminoácidos 2-D e 3-P (SEQ ID N°: 44)

Figura 11	Análise de SDS page de pD1/3-PRAME com ou sem sinal de secreção (SS) e Cauda de histidina (His) em vetor pET21.
Figura 12	Sequência de proteína D 1/3 MAGE-A3-His (SEQ ID N°: 44)
Construção 1 (Exemplo 1)	MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME – TSGHHHHHH (plasmídeo TCMP14) (sequência de nucleotídeo SEQ ID N°: 1; sequência de aminoácido SEQ ID N°: 2)
Construção 2 (Exemplo 2)	MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - nenhuma cauda His (plasmídeo TCMP14) (sequência de nucleotídeo SEQ ID N°: 3; sequência de aminoácido SEQ ID N°: 4)
Construção 3 (Exemplo 3)	MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - LEHHHHHH (plasmídeo pET21) (sequência de nucleotídeo SEQ ID N°: 5; sequência de aminoácido SEQ ID N°: 6)
Construção 4 (Exemplo 4)	MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - nenhuma cauda His (plasmídeo pET21) (sequência de nucleotídeo SEQ ID N°: 7; sequência de aminoácido SEQ ID N°: 8)
Construção 3a (Exemplo 3a)	MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - HHHHHH (plasmídeo pET26) (sequência de nucleotídeo SEQ ID N°: 9; sequência de aminoácido SEQ ID N°: 10)
Construção 4a (Exemplo 4a)	MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - nenhuma cauda His (plasmídeo pET26) (sequência de nucleotídeo SEQ ID N°: 11; sequência de aminoácido SEQ ID N°: 12)
Sequência 1 (SEQ ID N°: 1)	é a sequência de DNA para o Exemplo 1
Sequência 2 (SEQ ID N°: 2)	é a sequência de aminoácido para o Exemplo 1
Sequência 3 (SEQ ID N°: 3)	é a sequência de DNA para o Exemplo 2
Sequência 4 (SEQ ID N°: 4)	é a sequência de aminoácido para o Exemplo 2
Sequência 5 (SEQ ID N°: 5)	é a sequência de DNA para o Exemplo 3
Sequência 6 (SEQ ID N°: 6)	é a sequência de aminoácido para o Exemplo 3
Sequência 7 (SEQ ID N°: 7)	é a sequência de DNA para o Exemplo 4
Sequência 8 (SEQ ID N°: 8)	é a sequência de aminoácido para o Exemplo 4
Sequência 9 (SEQ ID N°: 9)	é a sequência de DNA otimizada por códon para o Exemplo 3a
Sequência 10 (SEQ ID N°: 10)	é a sequência de aminoácido para o Exemplo 3a
Sequência 11 (SEQ ID N°: 11)	é a sequência de DNA otimizada por códon para o Exemplo 4a
Sequência 12 (SEQ ID N°: 12)	é a sequência de aminoácido para o Exemplo 4a
SEQ ID N°: 13	VLDGLDVLL (PRA ¹⁰⁰⁻¹⁰⁹)
SEQ ID N°: 14	SLYSFPEPEA (PRA ¹⁴²⁻¹⁵¹)
SEQ ID N°: 15	ALYVDSLFFL (PRA ³⁰⁰⁻³⁰⁹)
SEQ ID N°: 16	LYVDSLFFL (PRA ³⁰¹⁻³⁰⁹)
SEQ ID N°: 17	SLLQHLIGL (PRA ⁴²⁵⁻⁴³³)
SEQ ID N°: 18 a 35	Oligonucleotídeos usados nos exemplos da presente invenção
SEQ ID N°: 36	TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826;)
SEQ ID N°: 37	TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

SEQ ID N°: 38	ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG TCG TCG TIT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
SEQ ID N°: 39	TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
SEQ ID N°: 40	TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)
SEQ ID N°: 41	AA 1 a 127 de proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i>
SEQ ID N°: 42	1-Met; 2-Asp; 3-Pro; seguido por AA 20 a 127 de proteína D
SEQ ID N°: 43	Sequência de aminoácido de proteína D 1/3- MAGE-A3-His
SEQ ID N°: 44	Aminoácidos de proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i> para o uso na sequência de pD1/3-PRAME-His sequência
SEQ ID N°: 45	Aminoácidos de proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i> para o uso na sequência pD1/3-MAGE-His

Sumário da invenção

A presente invenção fornece uma proteína de fusão que compreende:

- a) PRAME ou um fragmento imunogênico do mesmo, e
 - b) um parceiro de fusão heterólogo derivado da proteína D,
- em que a dita proteína de fusão não inclui a sequência de secreção (sequência sinalizadora) de proteína D.

A presente invenção ainda fornece uma proteína de fusão parceira como descrito neste derivado da proteína D, em que a proteína de fusão parceira não inclui a sequência de secreção ou sequência sinalizadora de proteína D.

A presente invenção ainda fornece uma proteína de fusão como descrito neste e um antígeno ou fragmento desta.

A presente invenção ainda fornece uma proteína de fusão parceira derivada da proteína D, em que a proteína de fusão parceira compreende ou consiste de aminoácidos 20 a 127 de proteína D. Em uma forma de realização da presente invenção, um ou mais aminoácidos da proteína de fusão parceira de proteína D como descrito neste podem ser anulados ou podem ser substituídos por substituição. Os aminoácidos podem ser substituídos por substituições conservativas como definido neste ou outros aminoácidos podem ser usados. Em uma forma de realização, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais aminoácidos podem ser substituídas.

A proteína de fusão parceira de proteína D como descrito neste

pode conter adicional ou alternativamente anulações ou inserções dentro da sequência de aminoácido em comparação com a sequência de proteína D do tipo selvagem. Em uma forma de realização, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais aminoácidos podem ser inseridos ou anulados.

5 O termo “sequência de secreção” ou “sequência sinalizadora” ou “sinal de secreção” de proteína D, no contexto deste pedido, é pretendido referir-se aproximadamente aos aminoácidos 1 a 17, 18 ou 19 da proteína de ocorrência natural. Em uma forma de realização, a secreção ou sequência sinalizadora ou sinal de secreção de proteína D refere-se aos 19 aminoácidos
10 de terminal N de proteína D. Os termos “sequência de secreção” ou “sequência sinalizadora” ou “sinal de secreção” são usados de maneira intercambiável no presente pedido.

A proteína de fusão parceira da presente invenção pode compreender a proteína de proteína D de comprimento total remanescente ou
15 pode compreender aproximadamente o terceiro terminal N remanescente de proteína D. Por exemplo, o terceiro terminal N remanescente de proteína D pode compreender aproximadamente ou em torno de aminoácidos 20 a 127 de proteína D. Em uma forma de realização, a sequência de proteína D para o uso na presente invenção compreende os aminoácidos 20 a 127 de proteína D.
20 Em uma outra forma de realização, a presente invenção compreende ou consiste de qualquer uma das sequências que começam em qualquer um dos seguintes aminoácidos de uma sequência de proteína D: 18, 19, 20, 21, ou 22 e terminação em qualquer um dos seguintes aminoácidos de uma sequência de proteína D: 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137,
25 138, 139 ou 140.

Por “remanescente” neste contexto é entendida a sequência da proteína D sem a secreção ou sequência sinalizadora como descrito neste.

Em uma forma de realização da presente invenção em que a proteína de fusão compreende PRAME ou um fragmento imunogênico do

mesmo, o derivado de proteína D da presente invenção compreende aproximadamente o primeiro 1/3 da proteína, mais especificamente os aminoácidos 20 a 127. Em uma forma de realização alternativa da presente invenção em que a proteína de fusão compreende PRAME ou um fragmento imunogênico do mesmo, a proteína D compreende aproximadamente o primeiro 1/3 da proteína em que os 109 aminoácidos de proteína D de terminal D são usados. Em uma forma de realização da presente invenção a porção de proteína D não inclui a sequência de secreção da proteína. Em uma forma de realização da presente invenção o derivado de proteína D não é lipidado.

Em uma forma de realização, a presente invenção fornece uma construção de proteína D, como descrito neste, como uma proteína de fusão parceira. A construção de proteína D pode ser uma proteína de fusão parceira para uma construção que compreende adicionalmente uma construção de a PRAME ou MAGE-A3 como descrito neste ou pode ser uma proteína de fusão parceira para uma construção que compreende adicionalmente um outro antígeno de câncer ou qualquer outro antígeno.

Parece que para proteínas de fusão que compreendem PRAME ou um fragmento imunogênico do mesmo e proteína D ou para proteínas de fusão que compreendem proteína D ou para uma proteína de fusão parceira que compreende proteína D, que a presença da sequência de secreção (ou sequência sinalizadora) pode afetar nocivamente a quantidade de proteína de fusão produzida.

PRAME

Em um aspecto a proteína de fusão da presente invenção compreende uma proteína de fusão parceira como descrito neste e um antígeno PRAME ou fragmento imunogênico do mesmo. No geral, a proteína PRAME tem 509 aminoácidos e em uma forma de realização todos os 509 aminoácidos de PRAME podem ser usados. Diversos epítopos de linfócito T

citotóxicos (CTL) foram identificados em PRAME, por exemplo,

VLDGLDVLL (PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸; SEQ ID N°: 13);

SLYSFPEPEA (PRA¹⁴²⁻¹⁵¹; SEQ ID N°: 14);

ALYVDSLFFL (PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹; SEQ ID N°: 15);

5 LYVDSLFFL (PRA³⁰¹⁻³⁰⁹; SEQ ID N°: 16) e

SLLQHLIGL (PRA⁴²⁵⁻⁴³³; SEQ ID N°: 17).

No geral, é desejável incluir tanto destes epítomos quanto possível no antígeno para a geração de uma resposta imune forte e garantir que o antígeno seja tão imunogênico quanto possível. embora, possa ser possível compensar uma imunogenicidade inferior de uma dada construção utilizando-se uma formulação com um adjuvante imunológico potente. Os adjuvantes fortes são debatidos abaixo em mais detalhes.

Em um aspecto, a invenção fornece a porção de PRAME de uma proteína de fusão que compreende, consistir de ou consistir essencialmente de proteína de comprimento total.

Entretanto, a invenção também estende-se a construções de PRAME por substituições conservativas. Em uma forma de realização, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais aminoácidos podem ser substituídos. A construção de PRAME como descrito neste pode conter, alternativa ou adicionalmente anulações ou inserções dentro da sequência de aminoácido em comparação com a sequência de PRAME do tipo selvagem. Em uma forma de realização, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais aminoácidos pode ser inseridos ou anulados.

As substituições conservativas são bem conhecidas e são, no geral, ajustadas como as matrizes de registro padrão em programas de computador de alinhamento de sequência. Estes programas incluem PAM250 (Dayhoft M. O. *et al.*, (1978), “A model of evolutionary changes in proteins”, Em “Atlas of protein sequence and structure” 5(3) M.O. Dayhoft (ed.), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington e Blosum 62 (Steven Henikoft and Jorja G. Henikoft (1992), “Amino acid substitution

matricies from protein blocks”), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915-10919.

Em termos gerais, a substituição dentro dos seguintes grupos são substituições conservativas, mas substituições entre os grupos são consideradas não conservadas. Os grupos são:

i) Aspartato/asparagina/glutamato/glutamina

ii) Serina/treonina

iii) Lisina/arginina

iv) Fenilalanina/tirosina/triptofano

v) Leucina/isoleucina/valina/metionina

vi) Glicina/alanina

No geral, a sequência de PRAME/aminoácidos usada nas proteínas de fusão da invenção serão mais do que 80%, tal como 85, 90, 95 e mais especificamente 99% idêntico ao PRAME de ocorrência natural. Entretanto, aqueles habilitados na técnica estão cientes que os resíduos de aminoácido gerados como um resultado do processo de clonagem podem ser retidos nas proteínas recombinantemente sintetizadas. Se este não afetar nocivamente as características do produto, é opcional se ou não estes são removidos.

Em um aspecto a invenção fornece uma proteína de fusão como descrito neste que compreende, consiste de ou consiste essencialmente de proteína de PRAME de comprimento total. Em um outro aspecto, a porção de PRAME da proteína de fusão da presente invenção compreende, consiste de ou consiste essencialmente de um ou mais dos seguintes epítopos:

VLDGLDVLL (PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸; SEQ ID N°: 13);
 SLYSFPEPEA (PRA¹⁴²⁻¹⁵¹; SEQ ID N°: 14);
 ALYVDSLFFL (PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹; SEQ ID N°: 15);
 LYVDSLFFL (PRA³⁰¹⁻³⁰⁹; SEQ ID N°: 16) e
 SLLQHLIGL (PRA⁴²⁵⁻⁴³³; SEQ ID N°: 17).

Proteínas de fusão

Em uma outra forma de realização da presente invenção, um outro antígeno tumoral que não PRAME ou além do PRAME pode ser usado em uma proteína de fusão como descrito neste. Em uma forma de realização, uma proteína de fusão é fornecida compreendendo uma proteína de fusão parceira como descrito neste e um ou mais dos seguintes antígenos de tumor ou derivados de antígeno de tumor ou uma porção imunogênica dos mesmos que é capaz de direcionar uma resposta imune ao antígeno: um antígeno MAGE, por exemplo, um antígeno MAGE-A, tal como MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE 12. Estes antígenos são algumas vezes conhecidas como MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11 e/ou MAGE A12 (a família MAGE A). Em uma forma de realização, um antígeno de uma de duas famílias MAGE adicionais pode ser usado: o grupo MAGE B e MAGE C. A família MAGE B inclui MAGE B1 (também conhecido como MAGE Xp1 e DAM 10), MAGE B2 (também conhecido como MAGE Xp2 e DAM 6) MAGE B3 e MAGE B4 – a família de Mage C correntemente inclui MAGE C1 e MAGE C2.

O antígeno MAGE para o uso na presente invenção pode compreender o antígeno MAGE de comprimento total. Alternativamente, o antígeno MAGE pode compreender uma porção imunogênica de MAGE em que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos podem ser anulados de ou substituídos na sequência de aminoácido. Em uma forma de realização da presente invenção, 2 aminoácidos podem ser anulados a partir do terminal N da sequência de MAGE. Em uma forma de realização da presente invenção em que o antígeno é MAGE-A3 ou uma porção imunogênica do mesmo, a sequência de MAGE-A3 pode ser de aminoácido 3 a 314 de MAGE-A3.

Em uma outra forma de realização, o antígeno tumoral ou

derivado para o uso na presente invenção pode ser PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2 (também conhecido como NY-ESO-1), SAGE, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, P501S (também conhecido como proteína), HASH1, HASH2, Cripto, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, Prostase, STEAP, tirosinase, telomerase, survivin, CASB616, P53 e/ou Her-2/neu ou uma porção imunogênica dos mesmos que é capaz de direcionar uma resposta imune ao antígeno.

Em uma outra forma de realização da invenção, o antígeno tumoral pode compreender ou consistir de um dos seguintes antígenos, ou uma porção imunogênica dos mesmos que é capaz de direcionar uma resposta imune ao antígeno: SSX-2; SSX-4; SSX-5; NA17; MELAN-A; P790; P835; B305D; B854; CASB618 (como descrito em WO00/53748); CASB7439 (como descrito em WO01/62778); C1491; C1584 e C1585.

Em uma forma de realização, o antígeno para o uso na presente invenção pode compreender ou consistir de P501S. P501S, também denominado prostateína (Xu et al., Cancer Res. 61, 2001, 1563-1568), é conhecido como SEQ ID N° 113 do WO98/37814 e é uma 553 proteína de aminoácido. Os fragmentos imunogênicos e porções destes que compreende pelo menos 20, preferivelmente 50, mais preferivelmente 100 aminoácidos contíguos como divulgado no pedido de patente referido acima pode ser usado nas proteínas de fusão da presente invenção. Os fragmentos preferidos são divulgados em WO 98/50567 (antígeno PS108) e como proteína associada com o câncer de próstata (SEQ ID N°: 9 de WO 99/67384). Outros fragmentos preferidos são aminoácidos 51-553, 34-553 ou 55-553 da proteína P501S de comprimento total.

Em uma forma de realização, o antígeno pode compreender ou consistir de WT-1 expressado pelo gene de tumor de Wilm ou uma porção imunogênica do mesmo que é capaz de direcionar uma resposta imune ao antígeno ou o fragmento de terminal N WT-1F que compreende cerca de ou

aproximadamente 1 a 249 aminoácidos de WT-1.

Em uma outra forma de realização, o antígeno pode compreender ou consistir do antígeno expressado pelo gene Her-2/neu ou um fragmento deste ou uma porção imunogênica do mesmo que é capaz de direcionar uma resposta imune ao antígeno. Em uma forma de realização, o antígeno de Her-2/neu pode ser uma das seguintes proteínas de fusão que são descritas no WO00/44899.

O antígeno para o uso na presente invenção pode compreender ou consistir de “proteína de fusão HER-2/neu ECDICD,” também referido como “ECD-ICD” ou “proteína de fusão ECD-ICD” que refere-se a uma proteína de fusão (ou fragmentos destes) que compreendem o domínio extracelular (ou fragmentos destes) e o domínio intracelular (ou fragmentos destes) da proteína HER-2/neu. Em uma forma de realização, esta proteína de fusão ECD-ICD não inclui uma porção substancial do domínio de transmembrana de HER-2/neu ou não inclui qualquer um dos domínios transmembrana HER-2/neu.

Em uma outra forma de realização, o antígeno pode compreender ou consistir de “proteína de fusão HER-2/neu ECD-PD,” também referido como “ECD-PD” ou “proteína de fusão ECD-PD” ou uma “proteína de fusão HER-2/neu ECD-APD”, também referido como “ECD-APD” ou “proteína de fusão de ECD-APD”, que refere-se à proteínas de fusão (ou fragmentos destas) que compreendem o domínio extracelular (ou fragmentos destes) e domínio de fosforilação (ou fragmentos destes, por exemplo, APD) da proteína HER-2/neu. Em uma forma de realização, as proteínas ECD-PD e ECD-APD de fusão não incluem uma porção substancial do domínio de transmembrana HER-2/neu ou não inclui qualquer um dos domínios de transmembrana HER-2/neu.

As proteínas de fusão do antígeno PRAME e proteína de fusão parceira de proteína D como descrito neste pode ser quimicamente conjugado,

mas são preferivelmente expressados como proteínas de fusão recombinantes, que podem permitir níveis aumentados de proteína PRAME a ser produzida em um sistema de expressão em comparação com PRAME sozinho sem parceiro de fusão, tal como proteína D ou proteínas D de proteína modificada.

5 Adicional ou alternativamente, os antígenos tumorais descritos neste e a proteína de fusão parceira da presente invenção pode ser quimicamente conjugado ou podem ser expressados como proteínas de fusão recombinantes, que pode permitir níveis aumentados de proteína PRAME ou um outro antígeno tumoral a ser produzido em um sistema de expressão em
10 comparação com PRAME ou um outro antígeno tumoral sozinho sem parceiro de fusão, tal como proteína D ou proteínas D de proteína modificada.

 Proteínas de fusão da presente invenção, como descrito neste, pode compreender adicionalmente uma ou mais sequências ligadoras entre uma proteína de fusão parceira e o antígeno tumoral ou porção imunogênica
15 deste ou entre uma proteína de fusão parceira e uma cauda His ou outro rótulo de afinidade (se presente) ou entre o antígeno tumoral ou porção imunogênica deste e uma cauda His ou outro rótulo de afinidade (se presente). Os aminoácidos nas sequências ligadoras pode não ser relacionadas às sequências do antígeno e/ou parceiro de fusão.

20 Proteínas de fusão da presente invenção, como descrito neste, pode compreender adicionalmente aminoácidos Met-Asp-Pro na extremidade de terminal N da sequência de proteína de fusão. O aminoácido Met pode ser da sequência de proteína D original ou pode ser de uma sequência não relacionada.

25 O parceiro de fusão pode auxiliar na expressão de uma proteína (intensificador de expressão) em rendimentos mais alto do que a proteína recombinante natural. A proteína de fusão parceira D, devido à sua natureza estranha, pode ser particularmente imunogênica *in vivo* e auxiliar a proteína de fusão que compreende PRAME ou um outro antígeno tumoral

fornecendo-se os epítomos auxiliares T, preferivelmente epítomos auxiliares T reconhecidos por células CD4 T. Acredita-se que tais células CD4-T podem contribuir para a geração de uma resposta imune favorável, em particular, uma resposta de célula T citolítica de CD8.

5 Em uma forma de realização, o parceiro de fusão pode atuar tanto como um parceiro de intensificação de expressão e um parceiro de fusão imunológica.

10 Em um aspecto a invenção fornece uma proteína de fusão em que a porção de terminal N de proteína D (como descrito acima ou neste) é fundido ao terminal N de PRAME ou um fragmento imunogênico do mesmo. Mais especificamente, a fusão com um fragmento de proteína D e o terminal N de PRAME é realizado tal que o PRAME substitui o fragmento de terminal C de proteína D que foi excisado. Desta maneira, o terminal N de proteína D torna-se o terminal N da proteína de fusão.

15 Em um outro aspecto, a invenção fornece uma proteína de fusão em que a porção de terminal N de proteína D (como descrito acima ou neste) é fundido ao terminal N ou uma outra porção de um antígeno tumoral ou um fragmento imunogênico do mesmo. Mais especificamente a fusão com um fragmento de proteína D e o terminal N ou outra porção de um antígeno tumoral pode ser afetado, tal que o PRAME ou outro antígeno tumoral ou derivado destes como descrito neste substitui o fragmento de terminal C de proteína D que foi excisado. Desta maneira, o terminal N de proteína D torna-se o terminal N de uma proteína de fusão.

25 Outros parceiros de fusão ou fragmentos destes podem ser incluídos nas proteínas de fusão da invenção ou pode substituir o elemento de proteína D da presente invenção, por exemplo, nas formas de realização que compreendem o antígeno PRAME ou um fragmento ou porção deste como descrito neste. Os exemplos de outros parceiros de fusão incluem:

- a proteína não estrutural do vírus influenza, NS1

(hemaglutinina) – tipicamente os 81 aminoácidos de terminal N são utilizados, embora fragmentos diferentes podem ser usados contanto que estes incluam epítomos auxiliares T,

- Derivado de LYTA de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza um N-acetil-L-alanina amidase, amidase LYTA, (codificado pelo gene *lytA* gene {Gene, 43 (1986) página 265-272} tal como a porção de repetição da molécula de Lyta encontrado na extremidade de terminal C, por exemplo, começando no resíduo 178, tal como os resíduos 188 a 305.

A purificação de proteínas híbridas contendo o fragmento C-LYTA em seu terminal amino foi descrito {Biotechnology: 10, (1992) páginas 795-798.

As proteínas de fusão da invenção podem incluir um rótulo de afinidade, tal como, por exemplo, uma cauda de histidina que compreende entre 5 a 9, tais como 6 resíduos de histidina. Estes resíduos podem, por exemplo, estar na porção de terminal de proteína D (tal como o terminal N de proteína D) e/ou pode ser fundido à porção de terminal do antígeno PRAME ou seu derivado ou o antígeno tumoral ou derivado deste como descrito neste. No geral, a cauda de histidina pode estar localizada na porção de terminal do antígeno PRAME ou derivado deste ou o antígeno tumoral ou derivado deste como descrito neste tal que a extremidade de terminal C do antígeno PRAME ou seu derivado ou o antígeno tumoral ou derivado deste como descrito neste. As caudas de histidina podem ser vantajosas no auxílio da purificação.

A presente invenção também fornece um ácido nucleico que codifica as proteínas da presente invenção. Tais sequências podem ser inseridas em um vetor de expressão adequado e usado para a vacinação de DNA/RNA ou expressado em um hospedeiro adequado. Os vetores microbianos que expressam o ácido nucleico pode ser usado como vacinas. Tais vetores incluem por exemplo, poxvírus, adenovírus, alfavírus, listeria e monofago.

Uma sequência de DNA eu codificam as proteínas da presente invenção podem ser sintetizados usando-se as técnicas de síntese de DNA padrão, tal como pela ligação enzimática como descrito por D. M. Roberts *et al.* em *Biochemistry* 1985, 24, 5090-5098, pela síntese química, pela
5 polimerização enzimática *in vitro* ou pela tecnologia de PCR que utiliza, por exemplo, uma polimerase estável de calor ou por uma combinação destas técnicas.

A polimerização enzimática de DNA pode ser realizada *in vitro* usando-se uma DNA polimerase, tal como DNA polimerase I
10 (fragmento Klenow) em um tampão apropriado contendo os trifosfatos de nucleosídeo dATP, dCTP, dGTP e dTTP como requerido em uma temperatura de 10° a 37°C, no geral em um volume de 50 µl ou menos. A ligação enzimática de fragmentos de DNA pode ser realizada usando-se uma DNA ligase tal como T4 DNA ligase em um tampão apropriado, tal como 0,05 M
15 de Tris (pH 7,4), 0,01 M de MgCl₂, 0,01 M de ditiotreitol, 1 mM de espermidina, 1 mM de ATP e 0,1 mg/ml de albumina de soro bovino, em uma temperatura de 4°C até a ambiente, no geral, em um volume de 50 ml ou menos. A síntese química do polímero de DNA ou fragmentos pode ser realizada pelo fosfotriéster convencional, fosfito ou química de fosforamidita,
20 usando-se as técnicas de fase sólida, tais como aqueles descritos em 'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual' (ed. H.G. Gassen and A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982), ou em outras publicações científicas, por exemplo M. J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat e R.C. Titmas, *Nucleic Acids Research*,
25 1982, 10, 6243; B. S. Sproat e W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*, 1983, 24, 5771; M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1980, 21, 719; M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 3185; S.P. Adams *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 661; N.D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus e H.

Koester, *Nucleic Acids Research*, 1984, 12, 4539 e H. W. D. Matthes *et al.*, *EMBO Journal*, 1984, 3, 801.

O processo da invenção pode ser realizada pelas técnicas recombinantes convencionais, tal como técnicas recombinantes convencionais, tais como descrito em Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

Em particular, o processo pode compreender as etapas de:

i) preparação de um vetor de expressão replicável ou de integração capaz, em uma célula hospedeira, de expressar um polímero de DNA que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína ou um derivado imunogênico deste;

ii) transformar uma célula hospedeira com o dito vetor;

iii) cultivar a dita célula hospedeira transformada sob condições que permitem a expressão do dito polímero de DNA para produzir a dita proteína e

iv) recuperar a dita proteína.

O termo 'transformação' é usado neste para significar a introdução de DNA estranho em uma célula hospedeira. Isto pode ser atingido, por exemplo, pela transformação, transfecção ou infecção com um plasmídeo apropriado ou vetor viral usando-se por exemplo, técnicas convencionais como descrito em *Genetic Engineering*; Eds. S.M. Kingsman and A.J. Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, Inglaterra, 1988. O termo 'transformado' ou 'transformante' será a seguir apropriado à célula hospedeira que contém e que expressa o gene estranho de interesse.

Os vetores de expressão são novos e também formam parte da invenção.

Os vetores de expressão replicáveis podem ser preparados de acordo com a invenção, pela clivagem de um vetor compatível com a célula hospedeira para fornecer um segmento de DNA linear tendo um replicon

intacto e combinando-se o dito segmento linear com uma ou mais moléculas de DNA que, junto com o dito segmento linear que codifica o produto desejado, tal como o polímero de DNA que codifica a proteína da invenção ou derivado deste, sob condições de ligação.

5 Desta maneira, o polímero de DNA pode ser pré-formado ou formado durante a construção do vetor, como desejado.

 A escolha do vetor será determinada em parte pela célula hospedeira pela célula hospedeira, que pode ser procariótica ou eucariótica mas são, no geral células de *E. coli* ou CHO. Os vetores adequados podem
10 incluir plasmídeos, por exemplo, TMCP14 ou pET21 ou pET26, pcDNA3, bacteriófagos, cosmídeos e vírus recombinantes.

 A preparação do vetor de expressão replicável pode ser realizada convencionalmente com enzimas apropriadas para restrição, polimerização e ligação do DNA, pelos procedimentos descritos em, por
15 exemplo, Maniatis *et al.* citado acima.

 A célula hospedeira recombinante é preparada de acordo com a invenção, pela transformação de uma célula hospedeira com um vetor de expressão replicável da invenção sob condições transformantes. As condições transformantes adequadas são convencionais e são descritas em, por exemplo,
20 por exemplo, Maniatis *et al.* citado acima ou “DNA Cloning” Vol. II, D.M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

 A escolha de condições de transformação é determinada pela célula hospedeira. Desta maneira, um hospedeiro bacteriano, tal como o *E. coli* pode ser tratado com uma solução de CaCl₂ (Cohen *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) ou com uma solução que compreende uma
25 mistura de RbCl, MnCl₂, acetato de potássio e glicerol e então com ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfônico, RbCl e glicerol. As células de mamífero na cultura podem ser transformadas pela co-precipitação de cálcio do DNA do vetor nas células. A invenção também estende-se a uma célula hospedeira

transformada com um vetor de expressão replicável da invenção.

O DNA pode ser otimizado por códon pelas técnicas padrões ainda para facilitar a expressão do hospedeiro relevante. Em uma forma de realização da presente invenção aqui é fornecido o DNA que codifica uma proteína de fusão que compreende um antígeno PRAME ou porção ou fragmento deste como descrito neste, em que a sequência de nucleotídeo do antígeno PRAME ou porção ou fragmento deste é otimizado por códon. Em uma forma de realização, uma sequência de nucleotídeo da proteína D não é otimizada por códon.

10 A cultura da célula hospedeira transformada sob condições permite a expressão do polímero de DNA seja realizado convenientemente, como descrito em, por exemplo, Maniatis *et al.* e “DNA Cloning” citado acima. Deste modo, preferivelmente a célula é fornecida com nutriente e cultivado em uma temperatura abaixo de 50°C.

15 As proteínas da presente invenção podem ser expressados em procariotas ou eucariotas tal como levedura mas são frequentemente expressados em cepas particulares de *E. coli* de *E. coli* tal como AR58 e BLR DE3 pode ser utilizado.

20 No geral um marcador de seleção de, por exemplo resistência à canamicina ou resistência à ampicilina é incorporado para facilitar a identificação da incorporação bem sucedida do gene recombinante/construção no sistema de expressão.

25 O produto é recuperado pelos métodos convencionais de acordo com a célula hospedeira e de acordo com uma localização do produto de expressão (intracelular ou secretado no meio de cultura ou no periplasma celular). Em uma forma de realização da presente invenção o produto de expressão é intracelular. Em uma forma de realização da presente invenção o produto de expressão é uma proteína insolúvel. Deste modo, onde a célula hospedeira é bacteriana, tal como *E. coli* este pode, por exemplo, ser lisado

fisicamente, quimicamente ou enzimaticamente e um produto da proteína isolado a partir de lisado resultante. Onde a célula hospedeira é mamífero, o produto pode ser no geral isolado a partir de meio nutriente ou a partir dos extratos livres celulares. As técnicas de isolamento da proteína convencional
5 inclui precipitação seletiva, cromatografia de absorção e cromatografia de afinidade incluindo uma coluna de afinidade de anticorpo monoclonal.

Em uma forma de realização da invenção aqui é fornecido um processo para a produção de uma proteína de fusão como descrito neste que compreende a etapa da expressão em uma célula de uma proteína de fusão
10 que compreende uma proteína de fusão parceira como descrito neste. A célula pode ser uma bactéria. Em uma forma de realização em que a célula é uma bactéria, a bactéria pode ser *E. coli*. O processo da presente invenção pode compreender a etapa da expressão de uma proteína de fusão como descrito neste na célula como uma proteína insolúvel. O processo ainda pode
15 compreender a etapa lisando uma célula e purificando a proteína de fusão expressada a partir das células lisadas.

Em uma forma de realização da invenção aqui é fornecido uma proteína de fusão obtida por ou obtível por um método ou processo descrito neste.

20 As proteínas da presente invenção são fornecidos solúvel em uma forma líquida ou em uma forma liofilizada.

Este é no geral esperado que cada dose humana compreenderá 1 a 1000 μg de proteína e preferivelmente 30 a 300 μg .

A presente invenção também fornece a composição
25 farmacêutica tal como vacina que compreende uma proteína de fusão da presente invenção em um excipiente farmacêuticamente aceitável.

A vacina pode opcionalmente conter um ou mais outros antígenos associados com o tumor ou polipeptídeos, ou preferivelmente ser combinado com outras vacinas contra câncer com base em um antígeno

associado ao tumor. Por exemplo, estes antígenos associados com o tumor pode ser antígenos como descrito neste e/ou pode ser membros pertencentes às famílias MAGE, LAGE e GAGE ou WT-1. Em uma forma de realização o antígeno associado ao tumor pode compreender ou consistir do antígeno MAGE-A3.

A preparação da vacina é no geral descrito em Vaccine Design (“The subunit and adjuvant approach” (eds. Powell M.F. & Newman M.J). (1995) Plenum Press New York). A encapsulação dentro dos lipossomas é descrito por Fullerton, Patente U.S. 4.235.877.

As proteínas da presente invenção podem ser preferivelmente submetidos à adjuvante na formulação da vacina da invenção. Os adjuvantes adequados podem incluir um sal de alumínio tal como gel hidróxido de alumínio (alum) ou fosfato de alumínio, mas também pode ser um sal de cálcio, ferro ou zinco, ou pode ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada, ou açúcares aciladas, polissacarídeos derivados cationicamente ou anionicamente, ou polifosfazenos. Outros adjuvantes conhecidos inclui oligonucleotídeos contendo CpG. Os oligonucleotídeos são caracterizados em que o dinucleotídeo CpG não é metilado. Tais oligonucleotídeos são bem conhecidos e são descritos em, por exemplo WO 96/02555.

Na formulação da invenção pode ser desejável que a composição adjuvante induz uma resposta imune preferivelmente do tipo TH1. Em uma forma de realização aqui é fornecido um sistema adjuvante incluindo, por exemplo uma combinação de lipídeo A de monofosforila, preferivelmente lipídeo 3-de-O-acilado de monofosforila (3D-MPL) junto com um sal de alumínio. O adjuvante também pode opcionalmente incluir os oligonucleotídeos CpG para induzir preferivelmente uma resposta TH1.

Um sistema intensificado que pode ser usado na presente invenção compreende a combinação de um lipídeo A de monofosforila e um derivativo de saponina particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL

como divulgado em WO 94/00153, ou, por exemplo uma composição menos reatogênica onde o QS21 é apagado com colesterol como divulgado em WO 96/33739.

5 Uma formulação que pode ser usado nas formulação da presente invenção, que compreende QS21 3D-MPL & tocoferol, por exemplo uma emulsão de água em óleo, é descrito em WO 95/17210.

10 Uma outra formulação adjuvante que pode ser usado na formulação da presente invenção é QS21, 3D-MPL & CpG ou equivalente deste, por exemplo uma emulsão de água em óleo ou como uma formulação lipossômica.

Conseqüentemente em uma forma de realização da presente invenção aqui é fornecido a vacina que compreende uma proteína de fusão ou proteína de fusão parceira como descrito neste e um adjuvante, por exemplo como descrito acima.

15 ***Combinação de PRAME e MAGE***

Em uma forma de realização da presente invenção aqui é fornecido uma composição que compreende (a) um componente antígeno que compreende um antígeno PRAME ou proteína de fusão como descrito neste e (b) um componente antígeno que compreende um antígeno MAGE ou
20 proteína de fusão como descrito neste. Em uma forma de realização, a composição ainda pode compreender um adjuvante como descrito neste.

O antígeno MAGE para o uso na combinação pode compreender o antígeno MAGE de comprimento total. Alternativamente, o antígeno MAGE pode compreender uma porção imunogênica de MAGE em
25 que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos podem ser anulados de ou substituídos na sequência de aminoácido. Em uma forma de realização da presente invenção, 2 aminoácidos podem ser anulados a partir do terminal N da sequência de MAGE. Em uma forma de realização da presente invenção em que o antígeno é MAGE-A3 ou uma porção imunogênica do mesmo, a

sequência de MAGE-A3 pode ser de 3 aminoácidos por 314 de MAGE-A3.

Para a combinação descrito acima, cada um ou ambos dos antígenos PRAME e/ou MAGE podem ser parte de uma proteína de fusão ou proteínas como descrito neste, ou os antígenos podem estar presentes em
5 outras proteínas de fusão ou pode estar apresentado como antígeno sozinho.

Em uma forma de realização da presente invenção aqui é fornecido uma composição que compreende uma proteína de fusão que compreende um antígeno PRAME e proteína de fusão parceira como descrito neste e uma proteína de fusão que compreende um antígeno MAGE-A3 e
10 proteína de fusão parceira como descrito neste. Em uma forma de realização alternativa, a proteína de fusão que compreende o antígeno MAGE-A3 compreende ou consiste do antígeno MAGE-A3 e uma proteína de fusão parceira que compreende aproximadamente os primeiros 109 aminoácidos de proteína D, em que um ou dois ou mais aminoácidos a partir da proteína D
15 são opcionalmente substituídos e em que a sequência sinalizadora de proteína D está opcionalmente presente, em adição aos primeiros 109 aminoácidos de proteína D.

As proteínas de fusão da presente invenção pode adicionalmente compreender opcionalmente um ou mais aminoácidos como
20 “ligadores” entre as sequências do antígeno e a proteína de fusão parceira ou entre o antígeno e uma cauda His, se presente. Os aminoácidos podem ser não relacionados às sequências do antígeno e/ou parceiro de fusão.

As proteínas de fusão da presente invenção, como descrito neste, pode adicionalmente compreender os aminoácidos Met-Asp-Pro no
25 final do terminal N da sequência da proteína de fusão. O aminoácido Met pode ser a partir da sequência da proteína D original ou pode ser a partir de uma sequência não relacionada.

Em uma forma de realização, a sequência de uma proteína de fusão que compreende MAGE-A3 e proteína D para o uso na presente

invenção é mostrada na Figura 12 e SEQ ID N°: 43.

A presente invenção também estende-se aos métodos de preparação das ditas vacinas/ composições.

EXEMPLOS

5 Quatro construções de fusão foram preparadas e serão referidas neste como Exemplos/construções 1, 2, 3 e 4. Uma construção otimizada por códon foi preparada a partir do exemplo 3 e é indicado como o exemplo 3a neste. Uma construção otimizada por códon foi preparada a partir do exemplo 4 e é indicado como o exemplo 4a neste.

10 Nos exemplos 3a e 4a a sequência à respeito da porção da proteína D da molécula é a mesma. Entretanto, certos códons na região PRAME foram modificados, por ainda melhorar a expressão e, no exemplo 3a, o ligador entre PRAME e sua cauda foram removidos.

15 **TABELA A** Estruturas da proteína de fusão e Detalhes de plasmídeos dos exemplos/Construções 1 a 4

		N-terminal-----C-terminal					
Exemplo/ Construção no.	Aminoácidos inseridos por processo de clonagem	Parceiro de fusão	Antígeno de câncer	Ligador/Seq. de aminoácidos com cauda His	Plasmídeo usado		
1	MDP	20-127 proteína D	PRAME	TSGHHHHHH	TCMP14		
2	MDP	20-127 proteína D	PRAME	-	TCMP14		
3	MDP	20-127 proteína D	PRAME	LEHHHHHH	pET21		
4	MDP	20-127 proteína D	PRAME	-	pET21		
3a	MDP	20-127 proteína D	PRAME	HHHHHH	pET26		
4a	MDP	20-127 proteína D	PRAME	-	pET26		

As proteínas de fusão dos exemplos acima compreende os aminoácidos 20 a 127 da proteína D. Os aminoácidos Met, Asp e Pro foram incluídos no terminal N do fragmento da proteína D (isto é aminoácidos da proteína D MDP-20-127). Esta é a idéia que estes três aminoácidos adicionais
5 podem ajudar a estabilidade da proteína e/ou aumento no nível da expressão da proteína deste. O aminoácido 127 da proteína D é fundido ao terminal N do PRAME de comprimento total (isto é aminoácido 127 da proteína D é fundido ao terminal N do PRAME). Uma cauda de rótulo de histidina, para ajudar a purificação, foi incluída em três das seis proteínas. A sequência exata
10 da cauda é dependente do plasmídeo usado.

Três tipos diferentes de plasmídeos, TCMP14 e pET21 ou pET26 foram construídos: para cada plasmídeo, DNA codificado para a proteína de fusão foi incluído com ou sem uma cauda de histidina.

A não ser de outra maneira estado a estratégia geral abaixo foi
15 usada na preparação de cada um dos exemplos.

Estratégia de clonagem para a geração de proteína recombinante PD1/3-PRAME (com ou sem His-tag) usando vetor TCMP14:

A amplificação das sequências apresentadas no plasmídeo TCMP14 foram feitas usando uma das três etapas da estratégia de PCR. O
20 vetor pHIC348 contendo a sequência de DNA que codifica o gene de proteína D inteiro foram obtidos de Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Suécia. A sequência de DNA da proteína D foram publicados por Janson et al. (1991) {Janson H, LO Heden, A Grubb, M Ruan, & A Forsgren. 1991. Infect Immun
25 59:119-125}. O vetor de expressão pMG81 é um derivado de pBR322, em que os elementos de controle derivados do bacteriófago X para a transcrição e tradução dos estranhos genes inseridos foram introduzidos (Shatzman et al., 1983) {Shatzman A, YS Ho, & M Rosenberg. 1983. Experimental Manipulation of Gene Expression. Inouya (ed) página 1 a 14. Academic NY}.

Além disso, o gene de resistência à ampicilina foi trocado com o gene de resistência à canamicina. A sequência codificadora para a porção da proteína NS1 (aminoácido 4 a 81) foi substituído pelos locais de clonagem múltiplos para obter pMG81 MCS. A sequência codificadora para 1/3 da proteína D (aminoácido 20 a 127) foi clonado em pMG8 1 MCS usando locais de restrição BamHI e NcoI para obter pMG81-1/3PD. Primeiro, a amplificação por PCR da seção corresponde aos aminoácidos 20 a 127 da proteína D e foi feito usando o vetor pMG81-1/3PD como modelo e sentido de oligonucleotídeo:

10 5' ATA TAA CAT ATG GAT CCA AGC AGC CAT TCA TCA AAT 3'
(CAN008; SEQ ID N°: 18) e anti-sentido:

5' CCA CAA ACG CCT TCG TTC CAT GGT TTC AAA GTT TTC TGT C
3' (CAN037; SEQ ID N°: 19).

O cDNA de PRAME obtido do Ludwig Institute, Bruxelas, Bélgica, foi inserido nos locais Bstx1-Not1 do vetor pCDNA1 (Invitrogen) para gerar o vetor recombinante pCDNA-1-PRAME.

A amplificação por PCR da seção corresponde ao aminoácido da proteína PRAME e foi feita usando o vetor pcDNA-1-PRAME (GSKBio) como modelo e sentido de oligonucleotídeo:

20 5' GAC AGA AAA CTT TGA AAC CAT GGA ACG AAG GCG TTT GTG
G 3' (CAN036; SEQ ID N°: 20) e anti-sentido:

5' AGA GAG ACT AGT CTA GTT AGG CAT GAA ACA GGG GCA CAG
3' (CAN029; SEQ ID N°: 21) ou

25 5' GGA GGA ACT AGT GTT AGG CAT GAA ACA GGG GCA CAG 3'
(CAN002; SEQ ID N°: 22) dependendo se uma cauda de histidina (CAN002) ou não (CAN029) for adicionado. A sequência PRAME final inserida no plasmídeo TCMP14 foi obtido seguindo uma amplificação de PCR usando os modelos dos genes 1/3PD e PRAME que foram gerados nas etapas preliminares para o modelo e sentido de oligonucleotídeo: CAN008, e anti-

sentido: CAN029 ou CAN002 dependendo se uma cauda de histidina está presente (CAN002) ou não (CAN029). NdeI na extremidade final de 5' e SpeI nos locais da extremidade final de 3' foram também adicionados para a clonagem do fragmento no vetor TCMP14.

5 **Construção do projeto do vetor para expressar a proteína recombinante 1/3PD-PRAME com ou sem proteína recombinante His-tag usando o vetor pET21:**

10 Um plasmídeo cDNA recombinante denominado pcDNA1-PRAME (como descrito na prévia estratégia) contendo uma sequência codificadora para o gene PRAME e o vetor PMG81-1/3PD (como descrito na prévia estratégia) contendo uma porção do terminal N da sequência codificadora da proteína D foram usados. A estratégia de clonagem inclui as seguintes etapas.

15 a) Primeiro, a sequência 1/3PD sem sinal de secreção (secreção ou sequência de sinal) foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo PMG81-1/3PD usando o sentido de oligonucleotídeo: 5'

AGAGAGCATATGAGCAGCCATTCATCAAATATGGCG (CAN040; SEQ ID N°: 22),

e o anti-sentido:

20 5' ACGTGGGCGGCCGCGGTTTCAAAGTTTTCTGTCATTTCTAA (CAN032; SEQ ID N°: 23);

NdeI nos locais da extremidade final 5' e NotI na extremidade final de 3' foram também adicionados para a clonagem do fragmento no vetor pET21b(+).

25 b) A sequência PRAME foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pcDNA1-PRAME usando o sentido de oligonucleotídeo:

5' TTGTTGGCGGCCGCAATGGAACGAAGGCGTTTGTGGGGT (CAN033; SEQ ID N°: 25), e o anti-sentido:

5' GGAGGACTCGAGGTTAGGCATGAAACAGGGGCACAG (CAN034;

SEQ ID N°: 26); Not1 nos locais da extremidade final 5' e Xho1 na extremidade final de 3' foram também adicionados para a clonagem do fragmento no vetor pET21b. Esta amplificação resultou na adição no terminal C da proteína de dois aminoácidos, Leu e Glu, seguido por 6 His no plasmídeo pET21b(+). Para a geração da proteína sem His-tag, um códon interrompido (TAG) foi adicionado na extremidade final de 3' do gene PRAME pelo uso de CAN033 e CAN035 (anti-sentido: 5' GGAGGACTCGAGCTAGTTAGGCATGAAACAGGGGCACAG (CAN035; SEQ ID N°: XX) em vez de CAN033 e CAN034.

10 c) A clonagem no plasmídeo pET21b(+) (Invitrogen) dos fragmentos amplificados acima.

d) Remoção do local de Not1 entre 1/3PD e PRAME pelo uso do kit de mutagênese direcionado ao local QuikChange II (Stratagene) e o sentido de oligonucleotídeo:

15 5' CAGAAAACCTTTGAAACCATGGAACGAAGGCG (CAN106; SEQ ID N°: XX), e o anti-sentido:

5' cgccttcggtccatggtttcaaagtttctg (CAN107; SEQ ID N°: XX).

20 e) Adição de dois aminoácidos Asp e Pro seguindo o Met na posição 1 no terminal N da proteína D 1/3 pela mutagênese e usando o sentido de oligonucleotídeo:

5'GGAGATATACATATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGG (CAN 104; SEQ ID N°: XX) e o anti-sentido:

5'CCATATTTGATGAATGGCTGCTTGGATCCATATGTATATCTCC (CAN 105; SEQ ID N°: XX).

25 **Construção do projeto do vetor para expressar o códon 1/3PD-PRAME da proteína recombinante otimizado (sem ou com His tag) no vetor pET26:**

O gene PRAME foi otimizado por códon e clonado na cadeia principal pGA4 com a adição de locais Not1 e Xho1 na extremidade final 5' e

na extremidade final 3' do gene otimizado respectivamente.

Este plasmídeo, denominado 0606420pGA4, foi usado para clonar o gene em fusão com o PD1/3 no vetor pET26 usando as seguintes etapas.

5 a) Remoção do fragmento Not1 / Xho1 corresponde à sequência PRAME otimizada com um códon interrompido na extremidade final 3' do gene a partir do plasmídeo 0606420pGA4.

10 b) Clonagem do fragmento PRAME otimizado em um plasmídeo pET26b(+) que contém o 1/3PD previamente clonado NdeI/Not1 com os oligonucleotídeos CAN040 e CAN032 como descrito acima e onde os aminoácidos Asp e Pro foram adicionados no terminal N pelo método da mutagênese com oligonucleotídeos CAN104 e CAN105.

c) Remoção do local de Not1 pela mutagênese com oligonucleotídeos: sentido

15 5' GACAGAAAAC TTTGAAACCATGGAACGTCGTCGTCGTCTGTGG (CAN123; SEQ ID N°: XX) e anti-sentido

5' CCACAGACGACGACGTTCCATGGTTTCAAAGTTTTCTGTC (CAN124; SEQ ID N°: XX). Este resultou na proteína de fusão 1/3PD-PRAME otimizada por códon sem Cauda de histidina.

20 d) O plasmídeo foi então usado como um modelo para a geração de 1/3PD-PRAME otimizado por códon com plasmídeo 6 His. A amplificação por PCR da proteína de fusão foi feita com oligonucleotídeos sentido

25 5' GGAATTCCATATGGATCCAAGCAGCCATTC (CAN 199; SEQ ID N°: XX) e a anti-sentido

5'GGAGCTCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGGCATAA AGCACGGGC (CAN 198; SEQ ID N°: XX); NdeI nos locais da extremidade final 5', Xho1 na extremidade final de 3' seguido por 6 His e um códon interrompido foi também adicionado para a clonagem do fragmento no vetor

pET26b(+).

e) Clonagem do fragmento amplificado no plasmídeo pET26b(+) a partir de Invitrogen.

Para a produção da proteína de fusão, a construção de DNA foi clonado no vetor de expressão TCMP14. Este plasmídeo utiliza os sinais a partir do DNA de fago lambda para levar a transcrição e tradução de genes estranhos inseridos. O vetor contém o promotor PL lambda PL, operador OL e dois locais de utilização (NutL e NutR) para aliviar os efeitos da polaridade transcricional quando a proteína N é fornecida (Gross et al., 1985. *Mot. & Cell. Biol.* 5:1015).

O plasmídeo que expressa a proteína de fusão pD-PRAME foi indicada de modo que os aminoácidos PRAME foram adicionados ao terminal C de 108 aminoácidos derivados de pD sem esta sequência de sinal (secreção ou sequência de sinal) (isto é resíduos 20 a 127). Para esta construção, três aminoácidos não relacionados (Met e Asp e um Proline) foram adicionados no terminal N do derivado de pD, e para certas construções de sua cauda no terminal C dos aminoácidos PRAME foi incluído (ver tabela A acima). Esta construção pode ser alternativamente descrito como contendo 109 aminoácidos derivados de pD, se o terminal N Met é considerado vir da sequência pD.

Cepa hospedeira e Transformação

Os hospedeiros da cepa de *E. Coli* AR58 (Mott et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 82, pp 88-92, janeiro de 1985, *Biochemistry*) foram transformados com DNA de plasmídeos para os Exemplos/ construções 1 e 2.

A cepa de *E. Coli* lisogênica AR58 usada para a produção dos Exemplos/construções 1 e 2 é um derivado da cepa K12 *E. Coli* NIH padrão N99 (F- su- galK2, lacZ- thr-). Este contém um fago lambda lisogênico defeituoso (galE::TN10,1 Kil- cI857 DH1). O fenótipo Kil evita o corte da síntese macromolecular hospedeira. A mutação cI857 confere uma lesão

sensível a temperatura ao repressor cI. A anulação DH1 remove o operon direito do fago lambda e os bio hospedeiros, uvr3, e local ch1A. A cepa AR58 foi gerado pela transdução de N99 com um estoque de fago lambda P previamente desenvolvido em um derivado de SA500 (galE::TN10,1 Kit-cI857 DH1). A introdução do lisogênio defeituoso em N99 foi selecionado com tetraciclina pela virtude da presença de um transposon TN10 codificado pela resistência da tetraciclina no gene galE adjacente. Os N99 e SA500 são cepas de *E.coli* K12 derivadas do Dr. Martin Rosenberg's laboratory at the National Institutes of Health.

Os vetores contendo um promotor PL, são introduzidos em um hospedeiro lisogênico de *E. coli* para estabilizar o DNA de plasmídeos. As Cepas hospedeiras lisogênicas contém DNA de fago lambda defeituoso por replicação integrado no genoma (Shatzman et al., 1983; In Experimental Manipulation of Gene Expression. Inouya (ed) páginas 1 a 14. Academic Press NY). O DNA de fago lambda direciona a síntese da proteína regressora cI que liga-se ao regressor OL do vetor e evita a ligação de polimerase de RNA ao promotor PL e portanto a transcrição do gene inserido. O gene cI da cepa da expressão AR58 contém uma mutação sensível à temperatura de modo que a transcrição direcionada por PL pode ser regulada pela mudança da temperatura, isto é um aumento na temperatura de cultura inativa o repressor e a síntese da proteína estranha seja iniciada. Este sistema de expressão deixa as proteínas estranhas da síntese controlada especialmente aquelas que podem ser tóxicas às células (Shimatoka & Rosenberg, 1981. Nature 292:128).

Os hospedeiros da cepa de *E. Coli* BLR (DE3) Novagen, WI, USA (número de catálogo: 69053-4) BLR (DE3) Novagen, WI, USA (número de catálogo: 69053-4) BLR é um derivado recA BL21 que melhora o monômero do plasmídeo produzido e pode ajudar a estabilizar os plasmídeos alvos contendo as sequências repetitivas ou cujo os produtos podem causar a

perda do pró-fago DE3 (1, 2) foram transformados com DNA de plasmídeos a partir do exemplos/construções 3 e 4.

5 Cada uma da transformação foi realizada pelos métodos padrões com células tratadas com CaCl_2 (Hanahan D. «Plasmid transformation by Simanis.»>> In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.).

Desenvolvimento e indução da cepa bacteriana hospedeira

• Cultura

10 As bactérias foram desenvolvidas em 20 ml de caldo Luria-Bertani (LB) (BD) + 1% de glicose p/v (Laboratoire MAT, número de catálogo: GR-0101) + antibiótico (Carbenicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ por pET21b, canamicina 40 $\mu\text{g/ml}$ por TCMP14). As culturas foram incubadas a 33°C, por células AR58 e a 37°C, por células BLR (DE3) até um O.D._{600nm} de cerca de 0,8.

15 **• Indução**

Em O.D._{600nm} de cerca de 0,8, as culturas BLR (DE3) foram induzidas em 1 mM de isopropila β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG; EMD Chemicals Inc., número de catálogo: 5815) e incubado por 2 horas ou 3 horas a 37°C embora a solubilidade possa ser aumentada se uma temperatura inferior for usada.

20 Em O.D._{600nm} de cerca de 0,8, as culturas AR58 foram induzidas pela ativação de calor a 37°C e incubado por 7 horas.

O desenvolvimento bacteriano foi adequado para os dois sistemas de expressões.

25 **• Extração e Purificação da proteína**

Na expressão do polipeptídeo em cultura, as células são tipicamente coletadas pela centrifugação então rompidas por meios químicos ou físicos (se o polipeptídeo expressado não é secretado no meio) e o extrato bruto resultante retido para isolar o polipeptídeo de interesse. O reagente de

extração de proteína BugBuster™ é usado sob condições recomendados pelos fornecedores (Novagen).

Purificação da proteína Prame-his PD1/3

5 A pasta de células de *E. coli* foi recolocada em suspensão em 20 mM de tampão de Tris pH 8,5 então passado através do sistema homogeneizador (Panda de Niro Soavi S.p.A. - 2 passagens - 750 bars). Após a adição de 2 mM de MgCl₂ e Benzonase (50 U/ml), o homogêneo foi incubado 1 hora em temperatura ambiente (RT) sob suave agitação então centrifugada 30 minutos a 15900 g e temperatura ambiente. O grânulo
10 resultante foi recolocado em suspensão em 20 mM de tampão de Tris pH 8,5 contendo 1% de sulfato de dodecila sódica (SDS) e 60 mM de Glutathione e incubados 30 minutos em temperatura ambiente sob suave agitação. Após a centrifugação 30 minutos a 15900 g e temperatura ambiente, o grânulo foi descartado.

15 O sobrenadante da centrifugação foi 10 vezes diluído em 20 mM de tampão de Tris contendo 6,66 M de uréia, 0,333 M de cloreto de sódio (NaCl) e 11,11 mM de Imidazol e então submetido à separação cromatográfica em uma coluna pela afinidade metálica do íon de níquel (Sefarose IMAC 6 FF GE Healthcare) equilibrado em um 20 mM de tampão
20 de Tris pH 8,5 contendo 0,1% de SDS, 6,0 M de uréia, 0,3 M de NaCl e 10 mM de Imidazol. Após a lavagem da coluna com 20 mM de tampão de Tris pH 8,5 contendo 0,5% de Sarcosila, 6,0 M de uréia, 0,3 M de NaCl e 10 mM de Imidazol, o antígeno foi eluído a partir da coluna pelo aumento da concentração de imidazol até 40 mM no mesmo tampão de lavagem. Após a
25 adição de fosfato até 50 mM, o antígeno positivo eluído foi passado através de uma coluna de tipo II de Hidroxiapatita Macro-Prep Ceramic (Bio-Rad) equilibrado em um 20 mM de tampão de Tris pH 8,5 contendo 50 mM de fosfato, 0,5% de Sarcosila, 6,0 M de uréia e 0,3 M de NaCl. O fluxo de Hidroxiapatita direto contendo um antígeno foi então diafiltrado contra 5 mM

de tampão de borato pH 9,8 contendo 3,15% de sacarose em uma membrana Omega 30 kDa (Pall). A retenção da ultrafiltração foi esterilizada pela filtração direta de uma membrana de acetato de celulose 0,45/0,22 μm (Sartorius). O material purificado foi armazenado a -70°C .

5 Um processo de purificação alternativo também foi usado, que difere-se do processo acima nas seguintes etapas:

- Nenhum tratamento de benzonase

- Nenhuma mudança de SDS por sarcosila na coluna IMAC (SDS a partir da extração até a etapa HA)

10 - O tampão usado para a diafiltração foi de 5 mM de tampão de Tris pH 8,5 – 0,5 M de Arginina. Este processo de purificação alternativo resultou em remoção SDS incompleta com valor residual de cerca de 0,05 e 0,085%.

• **Purificação**

15 As proteínas recombinantes expressadas foram purificadas a partir de frações sobrenadantes obtidas após a centrifugação de *E. coli* induzida usando uma resina de quelação metálica His-Bind (QIAGEN, Chatsworth, CA) de acordo com as instruções do fabricante da resina.

Caracterização da proteína

20 **SDS-Page:**

Gel: NuPAGE 4 a 12% de Bis-Tris Gel 1,0 mm 15 ou 26 reservatórios (número de catálogo Invitrogen: NP0323BOX)

25 Ver Figura 1 e 2 abaixo, que mostram a análise SDS page do Exemplo 3 e 4 e 3a e 4a respectivamente, em que as proteínas 1/3 pD-PRAME recombinantes diferentes com ou substituição page 30 sem his-tag migram em gel em um peso molecular aparente de ~ 70 kDa. As proteínas recombinantes são observadas como um corpo de inclusão no lisado celular de *E. coli*, após a indução.

Substituição pág. 30

As preparações das amostras, tampões e condições de migração foram feitas sob condições recomendadas pelos fornecedores (Invitrogen). 10 µl de todas as preparações foram carregados (antes da indução (BI) e após a indução (AI)) em reservatórios corresponde aos 100 µl de cultura equivalente.

Legenda da Figura 1: Análise SDS page após o tingimento Coomassie-blue de 1/3PD-PRAME recombinante após indução IPTG da cepa de E. coli BLR DE3 transformada com pET21 recombinante. Um equivalente de 100µL de cultura após 2 horas de indução na cepa BLR DE3 com 1 mM de IPTG a 25, 30 ou 37°C foram carregados em gel. Clone #3 (1/3PD-PRAME / pET21) e Clone #4 (1/3PD-PRAME-His / pET21) são apresentados em gel antes (BI) e após (AI) as induções em frações solúveis (sobrenadante) e não solúveis (grânulo). Linha 1 e 10: Pré-tingimento da faixa ampla padrão (BioRad Cat#161-0318), linha 2 (clone #3, BI, sobrenadante), linha 3 (clone #3, BI, grânulo), linha 4 (clone #3, AI, 25°C, sobrenadante), linha 5 (clone #3, AI, 25°C, grânulo), linha 6 (clone #3, AI, 30°C, sobrenadante), linha 7 (clone #3, AI, 30°C, grânulo), linha 8 (clone #3, AI, 37°C, sobrenadante), linha 9 (clone #3, AT, 37°C, grânulo), linha 11 (clone #4, BI, sobrenadante), linha 12 (clone #4, BI, grânulo), linha 13 (clone #4, AI, 25°C, sobrenadante), linha 14 (clone #4, AI, 25°C, grânulo), linha 15 (clone #4, AI, 30°C, sobrenadante), linha 16 (clone #4, AI, 30°C, grânulo), linha 17 (clone #4, AI, 37°C, sobrenadante), linha 18 (clone #4, AI, 37°C, grânulo).

Legenda da Figura 2: Análise SDS page após o tingimento Coomassie-blue de 1/3PD-PRAME recombinante após a indução IPTG da cepa de E. coli BLR DE3 transformada com pET26 recombinante. Um equivalente de 100 µL de cultura após 2 horas de indução na cepa BLR DE3 com 1mM de IPTG a 25, 30 ou 37°C foram carregados em gel. Clone #3a (1/3PD-PRAME otimizado por códon / pET26) e Clone #4a (1/3PD-PRAME-

His otimizado por códon / pET26) são apresentados em gel antes (BI) e após (AI) as induções em frações solúveis (sobrenadante) e não solúveis (grânulo).
Linha 2 e 10: Pré-tingimento da faixa ampla padrão (BioRad Cat#161-0318),
linha 1 (clone #3a, BI, sobrenadante), linha 3 (clone #3a, BI, grânulo), linha 4
5 (clone #3a, AI, 25°C, sobrenadante), linha 5 (clone #3a, AI, 25°C, grânulo),
linha 6 (clone #3a, AI, 30°C, sobrenadante), linha 7 (clone #3a, AI, 30°C,
grânulo), linha 8 (clone #3a, AI, 37°C,

Substituição de page 30a

sobrenadante), linha 9 (clone #3a, AI, 37°C, grânulo), linha 11 (clone #4a, BI,
10 sobrenadante), linha 12 (clone #4a, BI, grânulo), linha 13 (clone #4a, AI, 25°C,
sobrenadante), linha 14 (clone #4a, AI, 25°C, grânulo), linha 15 (clone #4a, AI,
30°C, sobrenadante), linha 16 (clone #4a, AI, 30°C, grânulo), linha 17 (clone #4a,
AI, 37°C, sobrenadante), linha 18 (clone #4a, AI, 37°C, grânulo).

Western Blot

15 As membranas foram bloqueadas por 30 minutos a 37°C, 60
RPM usando 3% de solução fresca de leite/PBS 1X. Após a incubação de
bloqueamento, os anticorpos primários foram adicionados (PRAME anti-
coelho; GSK Biologicals SA) em diluição de 1:5000 ou α -6X His tag
(AbCam) em diluição de 1:3000 em 3% de solução fresca de leite/PBS 1X
20 por 1 hora a 37°C, 60RPM. Depois que, as membranas foram lavadas três
vezes por 5 minutos em temperatura ambiente usando 0,02% de
Tween20/PBS 1X. Os anticorpos secundários foram adicionados (perox
donkey anti-IgG (H+L) rabbit (Jackson laboratory) em diluição de 1:20 000
usando 3% de solução fresca de leite/PBS 1X. As membranas foram
25 incubadas por 1 hora a 37°C, 60 RPM. Depois que, as membranas foram
lavadas três vezes por 5 minutos em temperatura ambiente usando 0,02% de
Tween20/PBS 1X antes das exposições das membranas pelo substrato de
peroxidase (KH₂PO₄, 10 mM; (NH₄)₂SO₄, 10 mM; O-dianisidina, 0,01% &
peróxido de hidrogênio 0,045%) ou substrato de fosfatase alcalina (Sigma

Fast) seguindo as recomendações dos fornecedores.

Análise molecular:

Exemplo/construção 1

Análise	Proteína inteira
Comprimento	629 aa
Peso molecular	71629.96 m.w.
1 micrograma =	13.961 pMol
Coefficiente de extinção molar	67680
1 A[280]coor. a	1,06 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,94 AU
Ponto isoelétrico	6,41
Carga a pH 7	-5,84
Ponto isoelétrico	6,41
Carga a pH 7	-5,84

Exemplo/construção 2

Análise	Proteína inteira
Comprimento	629 aa
Peso molecular	70561.90 m.w.
1 micrograma =	14.172 pMol
Coefficiente de extinção molar	67680
1 A[280]coor. a	1,04 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,96 AU
Ponto isoelétrico	6,28
Carga a pH 7	-6,36

5

Exemplo/construção 3

Análise	Proteína inteira
Comprimento	628 aa
Peso molecular	71627.01 m.w.
1 micrograma =	13.961 pMol
Coefficiente de extinção molar	67680
1 A[280]coor. a	1,06 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,94 AU
Ponto isoelétrico	6,34
Carga a pH 7	-6,84

Exemplo/construção 4

Análise	Proteína inteira
Comprimento	620 aa
Peso molecular	70561.90 m.w.
1 micrograma =	14.172 pMol
Coefficiente de extinção molar	67680
1 A[280]coor. a	1,04 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,96 AU
Ponto isoelétrico	6,28
Carga a pH 7	-6,36
Ponto isoelétrico	6,41
Carga a pH 7	-5,84

Exemplo 5: Avaliação da produção das proteínas com ou sem o sinal de secreção (secreção ou sequência de sinal) da proteína D 1/3 na proteína de fusão.

Tabela B

Proteína	Nível de expressão
PD1/3-PRAME com sinal de secreção	+
PD1/3-PRAME sem sinal de secreção	+++

5 Figura 11: Análise SDS page após o tingimento Coomassie-blue de 1/3PD-PRAME recombinante com ou sem sinal de secreção após a indução IPTG da cepa *E. coli* BL21 DE3 transformada com pET21 recombinante. Um equivalente de 100 μ L de cultura após 3 horas de indução na cepa BL21 DE3 com 1 mM de IPTG a 37°C foram carregados em gel.

10 Aquelas construções são apresentadas em gel antes (BI) e após (AI) as induções em frações solúveis (sobrenadante) e não solúveis (grânulo). Linha 1: Pré-tingimento da faixa ampla padrão (BioRad Cat#161-0318), linha 2 (pDI/3-PRAME + SS, BI, sobrenadante), linha 3 (pD 1 /3-PRAME + SS, BI, grânulo), linha 4 (pDI/3-PRAME + SS, AI, sobrenadante), linha 5 (pDI/3-

15 PRAME + SS, AI, grânulo), linha 6 (pDI/3-PRAME + SS + His, BI, sobrenadante), linha 7 (pDI/3-PRAME + SS + His, BI, grânulo), linha 8 (pDI/3-PRAME + SS + His, AI, sobrenadante), linha 9 (pDI/3-PRAME + SS + His, AI, grânulo), linha 10 (pDI/3-PRAME w/o SS, BI, sobrenadante), linha 11 (pDI/3-PRAME w/o SS, BI, grânulo), linha 12 (pDI/3-PRAME w/o SS,

20 AI, sobrenadante), linha 13 (pDI/3-PRAME w/o SS, AI, grânulo), linha 14 (pDI/3-PRAME w/o SS + His, BI, sobrenadante), linha 15 (pDI/3-PRAME w/o SS + His, BI, grânulo), linha 16 (pDI/3-PRAME w/o SS + His, AI, sobrenadante), linha 17 (pDI/3-PRAME w/o SS + His, AI, grânulo).

Exemplo 6: Imunogenicidade de PD-PRAME-His formulado em AS01B ou AS15: faixa de dosagem do antígeno em uma dose constante do adjuvante.

25

Objetivo: faixa de dosagem do antígeno para selecionar a melhor dosagem para o uso nos experimentos pré-clínicos.

Protocolo:

6 grupos de 12 camundongos CB6F1 que receberam injeções intra muscular (IM) no dia 0 e 14 de:

1. PBS
- 5 2. PRAME (50* μg) em AS01B ou AS15
3. PRAME (10 μg) em AS01B ou AS15
4. PRAME (2 μg) em AS01B ou AS15
5. PRAME (0,4 μg) em AS01B ou AS15
6. PRAME (0,08 μg) em AS01B ou AS15

10 * 44,7 μg atualmente administrado em vez de 50 μg da dose pretendida.

AS01B é uma formulação adjuvante lipossômica que compreende QS21 e 3D-MPL; AS15 é uma formulação adjuvante lipossômica que compreende QS21, 3D-MPL e CpG.

15 A construção usado neste exemplo foi Exemplo/Construção 3a (pET26 com a sua cauda), fornecido em 5 mM de tampão de Tris pH 8,5 – 0,5 M de Arginina. A proteína fornecida em um tampão de borato com sacarose também pode ser usado.

Leituras:

- Tingimento de citocina intracelular (ICS) 14 dias pós 2
20 injeções, após a reestimulação in vitro das células do baço (4 grupos de 3 camundongos por grupo) com o grupo de peptídeos PRAME em 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /peptídeo (15-mer)

Resposta CD4 (adjuvante AS01B)

25 Os resultados de ICS para as citocinas DC4 pelo adjuvante AS01B são mostrados na Figura 3. Neste experimento este pode ser concluído que a melhor dosagem do antígeno PRAME para induzir uma resposta CD4 em AS01B sob estas condições vistas ser 2 μg .

Resposta CD8 (Adjuvante AS01B)

Os resultados de ICS para as citocinas CD8 pelo adjuvante

AS01B são mostrados na Figura 4. Os dados parecem mostrar uma resposta CD8 muito baixa e heterogenicidade do intra-grupo de resposta.

Resposta CD4 (adjuvante AS15)

Os resultados de ICS para as citocinas DC4 pelo adjuvante AS15 são mostrados na Figura 5. Este dados parecem mostrar que uma similar Resposta CD4 foi induzida com 441 µg, 101 µg, 21 µg e 0,41 µg do PRAME formulado em AS15; com uma resposta diminuída induzida com 0,08 µg PRAME

Resposta CD8 (adjuvante AS15)

Os resultados de ICS para as citocinas CD8 pelo adjuvante AS15 são mostrados na Figura 6. Este dados parecem mostrar nenhuma resposta CD8 (fundamento no grupo PBS)

Exemplo 7: Em resumo, para as invenções descritas neste, o seguinte resumo pode ser usado para descrever as construções específicas de PD1/3-PRAME que até agora foram geradas:

Construções usadas pelo PD1/3-PRAME.

- Nenhuma sequência de sinal da proteína D são incluídas (aminoácidos 2 a 19 da proteína D)

- A metionina da proteína D é incluída. (AA 1 da proteína D)

- Dois AA não relacionados (Asp e Pro) são substituídos por aminoácidos 2-Lys e 3-Leu da proteína D.

- O primeiro 109 AA da proteína D após a sequência de sinal da proteína D são incluídos (109 aminoácidos incluindo o primeiro Met no termo N + AA20 por 127 da proteína D)

- AA 1 - 509 do PRAME são incluídos (sequência original de comprimento total do PRAME)

- Com ou sem a sua cauda composta por um dos seguintes:

• Três aminoácidos não relacionados (Thr, Ser e Gly) + 6 His resíduos para a clonagem no plasmídeo TCMP14; ou

- Dois aminoácidos não relacionados (Leu e Glu) + 6 His resíduos para a clonagem no pET21 plasmídeo; ou
- 6 His resíduos para a clonagem no plasmídeo pET26.

pD1/3 - PRAME +/- proteína da cauda de His:

	pD 1/3 20 - 127	PRAME 1 - 509	
MDP termo N	pD 1/3	PRAME	Termo C
MDP termo N	pD 1/3	PRAME	TSG 6xHis (in TCMP14) Termo C
MDP termo N	pD 1/3	PRAME	LE 6xHis (in pET21) Termo C
MDP termo N	pD 1/3	PRAME	6xHis (in pET26) Termo C

5 Uma sequência de aminoácido marcada dos Exemplos das construções da presente invenção é mostrada na Figura 7.

Alinhamentos das seguintes construções são mostradas na Figures 8, 9 e 10:

Alinhamento entre LipoD-MAGE3-His e D1/3-PRAME-His (Figura 8) Alinhamento entre a sequência formada da proteína D original da *Haemophilus influenzae* e o LipoD-MAGE3-His (Figura 9).

Alinhamento entre a sequência formada da proteína D original da *Haemophilus influenzae*, o LipoD-MAGE3-His e o pD1/3-PRAME-His (Figura 10).

15 **Formulação da preparação da vacina usando as proteínas de fusão:**

As proteínas de fusão da invenção podem ser formuladas nas vacinas que são submetidas à adjuvante ou não. Em uma forma de realização, como um adjuvante, a formulação pode compreender uma mistura de 3 de -O-lipídeo A de monofosforila acilado (3D-MPL) e QS21 em uma emulsão 20 água/óleo. O sistema de adjuvante SBAS2 foram previamente descrito no WO 95/17210. O adjuvante para o uso na presente invenção pode alternativamente compreender 3 de -O-lipídeo A de monofosforila acilado (3D-MPL), QS21 e CpG em uma formulação água em óleo ou em uma formulação lipossômica.

25 **3D-MPL:** é um imunoestimulante derivado de lipopolissacarídeos (LPS) da bactéria Gram-negativo *Salmonella minnesota*. O MPL foram desacilados e é necessitado de um grupo fosfato na metade do

lipídeo A. Este tratamento químico dramaticamente reduz a toxicidade enquanto preserva as propriedades imunoestimulantes (Ribi, 1986).

5 Este é acreditado que 3D-MPL combinado com vários veículos pode fortemente intensificar tanto um tipo humoral quanto TH1 da imunidade celular.

10 **QS21**: é uma molécula de saponina natural extraída da casca da árvore Sul Americana Quillaja saponaria Molina. Uma técnica de purificação desenvolvida para separar as saponinas individuais a partir dos extratos brutos da casca, deixando o isolamento da saponina particular, QS21, que é um triterpeno glicosídeo que demonstra a atividade adjuvante mais forte e toxicidade inferior como comparado com o componente original. O QS21 foi mostrado ativar a classe I MHC restrita por CTLs em diversas subunidades Ags, bem como estimular a proliferação linfocítica específica por Ag (Kensil, 1992).

15 Esta é a idéia que aqui pode ser um efeito sinérgico de combinações de MPL e QS21 na indução de respostas imunes celulares tanto humorais quanto TH1.

A **emulsão água/óleo** compreende uma fase orgânica feita de 2 óleos

20 (um tocoferol e esqualeno), e uma fase aquosa de PBS contendo Tween 80 como emulsificador. a emulsão compreendida de 5% de esqualeno 5% de tocoferol 0,4% de Tween 80 e tem um tamanho média da partícula de 180 nm e é conhecido como SB62 (ver WO 95/17210). Os dupletos de óleo resultante devem ter um tamanho de aproximadamente 180
25 nm.

O adjuvante para o uso na presente invenção pode ser formulado como uma combinação de MPL e QS21, em uma emulsão água/óleo ou em uma formulação lipossômica. Esta preparação deve ser liberada em frascos de 0,7 ml a ser misturado com antígeno liofilizado ou

proteína de fusão (frascos contendo de 30 a 300 µg de antígeno).

Os oligonucleotídeos imunoestimuladores também podem ser usados. Os exemplos de oligonucleotídeos para o uso em adjuvantes ou vacinas da presente invenção incluem oligonucleotídeos contendo CpG, no
 5 geral dois ou mais motivos de dinucleotídeos CpG separados por pelo menos três, mais frequentemente pelo menos seis ou mais nucleotídeos. Um motivo CpG é um nucleotídeo de citosina seguido por um nucleotídeo de guanina. Os oligonucleotídeos CpG são tipicamente deoxinucleotídeos. Em uma forma de realização os internucleotídeos nos oligonucleotídeos é fosforoditioato, ou
 10 mais preferivelmente uma ligação de fosforotioato, apesar do fosfodiéster e outras ligações de internucleotídeos estão dentro do escopo da invenção. Também incluído dentro do escopo da invenção são os oligonucleotídeos com as ligações de internucleotídeos misturados. Os métodos para a produção de fosforotioato de oligonucleotídeos ou fosforoditioato são descritos em US
 15 5.666.153, US 5.278.302 e WO 95/26204.

Exemplos dos oligonucleotídeos são como os seguintes:

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826; SEQ ID N°: 36)

TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758; SEQ ID N°: 37)

ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG TCG TCG TTT TGT CGT TTT
 20 GTC GTT

(CpG 2006; SEQ ID N°: 38)

TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668; SEQ ID N°: 39)

TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456; SEQ ID N°: 40),

as sequências podem conter fosforotioato modificados pelas ligações de
 25 internucleotídeos.

Os oligonucleotídeos CpG alternativos podem compreender um ou mais sequências acima em que estes tem anulações ou adições inconsequenciais destes.

Os oligonucleotídeos CpG podem ser sintetizados por qualquer

método conhecido na técnica (por exemplo ver EP 468520). Convenientemente, tais oligonucleotídeos podem ser sintetizados utilizando um sintetizador automático.

5 Em uma forma de realização da presente invenção uma combinação de adjuvante para o uso na invenção inclui um ou mais dos seguintes componentes: 3D-MPL e QS21 (EP 0 671 948 B1); emulsões água em óleo que compreendem 3D-MPL e QS21 (WO 95/17210, WO 98/56414); ou 3D-MPL formulados com outros carregadores (EP 0 689 454 B1). Outros sistemas de adjuvantes que podem ser usados na presente invenção
10 compreendem uma combinação de 3D-MPL, QS21 e um oligonucleotídeo CpG como descrito em US 6558670 e US 6544518.

A vacina final pode ser obtida após a reconstituição da formulação liofilizada.

Referências:

- 15
1. A. Roca (U. of Wisconsin), personal communication.
 2. Studier, F.W. (1991) *J. Mol. Biol.* 219, 37 a 44.
 3. Jan H. Kessler^a *et al* *The Journal of Experimental Medicine*, Volume 193, número 1, 1 de janeiro, 2001 73-88,
 4. Ikeda H *et al* *Immunity*, Fev.; 6(2): 1997, 199-208

SEQ ID NO: 1

Sequência de DNA para o Exemplo 1

atggatccaageagccattcatcaaatatggcgaataccacaastgaaateagacaaaatcattattgctc
 accgtgggtgctagcgggttatttaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcgtttgacacacaggc
 tgattatntagagcaagatttagcaatgactaaggatggctggttagtggttattcacgatcacttttta
 gatggcttgaactgatggttgcgaaaaaatteccacategctcctegtaaaagatggccttactatgtcatcg
 actttaccttaaaagaaaatcaaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacccatggaacgaaggcggtt
 gtgggggttcattcagagccgatacatcagcatgagtggtggtggacaagccccacggagacttgtggagctg
 gcagggcagagcctgctgaaggatgaggccctggccattgcccctggagttgctgccagggagctct
 tcccgcactcttcatggcagcctttgacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgcaggcctg
 gcccttcacctgcctccctctgggagtgctgatgaagggacaacatcttcacctggagacctcaaaagct
 gtgcttgatggacttgatgtgctccttggccaggaggttcgccccaggaggtggaaacttcaagtgtgg
 atttacggagaactctcatcaggacttctggactgtatggtctggaaacagggccagctctgtactcatt
 tcagagccagaagcagctcagcccatgacaaaagaagcgaaaagtagatggtttgagcacagaggcagag
 cagcccttcattccagtagagggtgctcgttagacctgttccctcaaggaagggtgcctgtgatgaattgtct
 cctacctcattgagaaagtgaagcgaagaaaaatgtactacgcctgtgctgtaagaagctgaagatctt
 tgeaatgcccatgcaggatataagatgatcctgaaaatggtgcagctggactctattgaagattggaa
 gtgacttgtacctggaagctaccacacttggcgaaaatttctccttacctgggcccagatgattaatctgc
 gtgactcctcctctccacatccatgcactctcctacatttcccgggagaaggaagagcagtatatcgc
 ccagttcacctctcagttcctcagttcagtcagtcgctgcaggctctctatgtggactctttattttccct
 agaggccgctggatcagttgctcaggcacgtgatgaacccttggaaaccctctcaataactaactgcc
 ggcttccggaaggggatgtgatgcactctgtcccagagtcaccagcctcagtcagctaaagtgtcctgagct
 aagtgggggtcatgctgaccgatgtaagtcccagccctccaaagctctgctggagagagcctctgccacc
 ctccaggacctggctcttgatgagtggtggatcacggatgatcagctccttggccctcctgccctccctga
 gccactgctcccagcttacaaccttaagctctacgggaattccatctccatatactgcttgcagagctct
 cctgcagcacctcatcgggctgagcaatctgaccacagtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
 gacatccatggtaccctccacctggagaggcttgcctatctgcatgccagagctcagggagttgctgtgtg
 agttggggggcccagcagctggcttagtgccaaaccctgtcctcactgtggggacagaaacctcteta
 tgaccggagcccatcctgtgcccctgttctatgcctaactagtgggccaccatcaccatcaccat

SEQ ID NO: 2

Sequência de aminoácidos para o Exemplo 1

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
 EGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRLWGSIQSRYISMSVWTSPPRLVEL
 AGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGGHLLHLETFKA
 VLDGLDVLVLAQEVPRPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVMSGNRASLYSPPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAR
 QPFIPEVVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVKRKNVLRLLCCKLKIIFAMPQDIKMLIKMVQLDSIEDLE
 VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFL
 RGRILDQLLAKVMNPLETSLITNCRLLSEGDVMHLSQSPSVSGLVLSLGSVMLTDVSPPELQALLERASAT

LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQITTLSTFYGNSISISALQSLQLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGTLHLERLAYLHARLRRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNTSGHHHHHH

SEQ ID NO: 3

Sequência de DNA para o Exemplo 2

atggatccaagcagccattcatcaaatatggcgaatacccaaatgaaatcagacaaaatcattatgtctc
accgtggtgctagcgggtatctaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcgtttgcacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaaatgactaaggatggctcgttagtggttattcacgatcaactttta
gatggcttgactgagtgctgcgaaaaaattcccacatcgtcaatcgttaaagatggcggcttactatgtcatcg
actttaccttaaaagaaatccaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacctggaacgaaggcgttt
gtgggggtcccatcagagccgatatacatcagcatgagtggtggtggacaagcccacggagacttgaggagctg
gcagggcagagcctgctgaaggatgaggccctggccattgccgccctggagtgctgcccagggagctct
tcccgcactcttcatggcagccttgacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgagggcctg
gcccctcaectgcctcctctgggagtgctgatgaagggacaacatctcacctggagacctcaaaagct
gtgcttgatggacttgatgtgctccttgcccaggaggttcgcccaggaggtggaacttcaagtgctgg
atctacggaagaactctcatcaggactctcggactgtatggctcggaaacagggccagctctgtactcatt
tccagagccagaagcagctcagcccatgacaaagaagcgaagaaagtagatggttgagcacagagccagag
cagccctcattccagtagaggctgctcgttagacctgttctcaaggaaggtgctgtagaattgttct
cctacctcattgagaaagtgaagcgaagaaaaatgtactacgctgtgctgtaagaagctgaagattt
tgcaatgcccattgcaggatatacaagatgatcctgaaaaatgggtgcagctggactctattgaaagattggaa
gtgacttgtaacctggaagctaccacacttgccgaaaatttctccttacctgggcccagatgattaatctgc
gtagactcctcctctcccacatccatgcatcttctctacattcccgggagaaggagagcagfatatcgc
ccagttcaectctcagttcctcagttctcagtgctcagtgccctgcaggctctctctatgtggactctttatcttct
agaggccgctggatcagttgctcaggcagctgatagaaccccttggaacccctctcaataactaactgcc
ggcttccggaaggggatgtagatgcatctgtcccagagctcccagcctcagtcagctaaagtgcctgagctc
aagtggggtcattgctgacggatgtaagtcggagccctccaagctctgctggagagagcctctgccacc
ctccaggacctggctcttgatgagtgaggatcacggatgatcagctccttgccctcctgecttccctga
gccaactgctcccagcttacaaccttaagctctcagggaaatccatctccatctgecttgagagctc
cctgcagcacctcatcgggctgagcaatctgaaccacgtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
gacatccatggtaccctccaactggagaggettgctctctgcatgcccaggtcagggagttgctgtgtg
agtgggggcggcccagcatggtctggcttagtgccaaccctgtcctcactgtggggacagaacctcta
tgaccgggagcccatctgtgcccctgttcatgcctaac

SEQ ID NO: 4

Sequência de aminoácidos para o Exemplo 2

MDPSSSHSSNMANTQNKSDKIIIAHRGASGYLPENTLESKALAFAPQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPHRHRKDORYVIDPFLKEIQSLEMTENPETMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSPPRRLVEL
AGQSLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFFKA
VLDGLDVLAAQEVRRRWKLOVLDLRKNSHQDFWTVWVSGNRASLYSFPPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAE
QPFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKVKRKKVLRCLCKKLLKIFAMPMDIKMILKMVQLDSIEDLE
VTCTWKLPTLAKFSPYLQGMINLRRLLSHIHASSYISPEKEBQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFPFL
RGRLDQLLRVMNPLETSLITNCRLESGDVMHLSQSPSVLSVLSLSGVMLTDVSPPELQALLERASAT
LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQITTLSTFYGNSISISALQSLQLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGTLHLERLAYLHARLRRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

SEQ ID NO: 5**Sequência de DNA para o Exemplo 3**

atggatccaagcagccattcatcaaatatggcgaataaccgaaatgaaatcagacaaaatcattattgctc
 accgtgggtgctagcgggtattttaccagagcatacgttagaatctaaagcaacttgcgtttgcacaacagggc
 tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggctcgttttagtggttattcacgateacttttta
 gatggcttgactgatgttcgaaaaaattcccacatcgtcatcgtaaagatggcgttactatgcatcg
 actttaccttaaaagaaat tcaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaaccatggaacgaggcgttt
 gtgggggtccattcagagccgatacatcagcatgagtggtggacaagcccacggagacttgtggagctg
 gcagggcagagcctgctgaaggatgagggcctggccattgcccgcctggagttgctgccaggagctct
 tcccgcactctctatggcagccttggacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgcaggcctg
 gcccttcaactgctccctctgggagtgctgatgaagggacaacatcttcaactggagacctcaagct
 gtgcttgatggacttgatgtgctccttggccaggaggttcgcccaggaggtggaaacttcaagtgtgg
 atttacggagaactctctacaggaacttctggactgtatggtctggaacagggccagctctgactcatt
 tccagagccagaagcagctcagccatgacaaagagcgaagagtagatggtttgagcagagggcagag
 cagcccttcatccagtagaggtgctcgttagacctgttctcaaggaaggtgcctgtgatgaattgttct
 cctacctcattgagaagtgagcgaagaaaaatgtactacgcctgtgctgtaagaagctgaagatttt
 tgcaatgcccatgcaggatatacaagatgatcctgaaaatgggtgcagctggactctattgaagatttggaa
 gtgacttgctacctggagctacccaccttggogaaattttctcttacctgggacagatgattaatctgc
 gtagactcctcctcccacatccatgcatcttctacat tcccgggagaaggaagagcagtatatcgc
 ccagttcacctctcagttcctcagctctgcagtgctgcaggctctctatgtggactctttatttttctt
 agaggccgctggatcagttgctcaggcagctgatgaaccccttggaaacctctcaataactaactgcc
 ggcttccggaaggggatgtgatgcatctgtcccagagctccagcgtcagtcagctaaagtgtcctgagct
 aagtggggctcatgctgaccgatgtaagtcggagccctccaagctctgctggagagagcctctgcccacc
 ctccaggacctggtctttgatgagtgaggatcacggatgatacagctccttgcctcctgcttccctga
 gccactgctcccagcttacaaccttaagcttctacgggaat tccatctc atatctgcttgcagagct
 cctgcagcaactcatcgggctgagcaatctgaccacgtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
 gacatccatgggtaccttccacctggagaggettgcctatctgcatgccaggctcagggagttgctgtgtg
 agttggggggccagcagctggtctggctt agtgc caaccctgtcctcactgtggggacagaaccttcta
 tgaccggagccatcctgtgcccctggttctatgectaacctcgagcaccaccaccaccacc

SEQ ID NO: 6**Sequência de aminoácidos para o Exemplo 3**

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
 DGLTDVAKKFPHRHRKDRYVVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLWGSIQSRYISMVWTSPPRRLVEL
 AGQSLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLET FKA
 VLDGLDVLIAQEVRRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPPEFAAQPMTKKRKVDGLSTSAE
 QPFI PVEVLVDLFLKRGACDELFSYLIEKVKRKKQVLRLLCCKKLIKIFAMPQDIKMIKMNVLDSIEDLE
 VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQPLSLQCLQALYVDSLFPFL
 RGRLDQLLRHVMNPLBTLSTNCRLESGDVMHLSQSPSVSLSVLSLSSVMLTDVSPPEPLQALLERASAT
 LQDLVPDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSPYGNSSISISALQSLQHLIGLSNLTHVLYFVPLESYE
 DIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMWL SANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNLEHHHHH

SEQ ID NO: 7**Sequência de DNA para o exemplo 4**

atggatccaagcagccatctcaaatatggcgaatacccaaatgaaatcagacaaaatcattattgctc
accgtggtgctagcggttattaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcgtttgcacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggctcggttagtggttattcacgatcactttta
gatggcttgactgatgttcgcaaaaaattcccacatcgtcatcgttaagatggcgttactatgtcatcg
actttaccttaaaagaaattcaaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacctggaacgaaggcgtt
gtggggttccattcagagccgatacatcagcatgagtggtggacaagcccaaggagacttgggagctg
gcagggcagagcctgctgaaggatgaggccctggccattgccgacctggagtgtgtgccagggagctct
tcccgccactcttcatggcagcctttgacgggagacacagccagacccctgaaggcaatgggtgcaggcctg
gccttcaactgctcctctgggagtgctgatgaagggacaacatcttcaactggagaccttcaagct
gtgcttgatggacttgatgtgctccttggccaggaggttcgccccaggaggtggaacttcaagtgtgg
atttacggaagaactctcatcaggacttctggactgtatggtctggaacagggccagtctgtactcatt
tcagagccagaaagcagctcagccatgacaaaagcgaagagtagatggtttgagcacagaggcagag
cagcccttcatctcagtagaggtgctcgttagacctgttctcaaggaaggtgctgtgatgaattgttct
cctacctcatgagaaagtgaagcgaagaaaaatgtactacgctgtgctgtaagaagctgaagattt
tgcaatgcccatgcaggatcaagatgatcctgaaaatgggtgcagctggactctattgaagattggaa
gtgacttgtaacctggaagctaccacacttggcgaattttctccttacctgggccagatgataatctgc
gtagactcctcctcctccacatccatgcacttctctacatttcccggagaaggaagagcagtatacgc
ccagttcacctctcagttcctcagctcgcagtgctgcaggtctctatgtggactcttatttttctt
agaggccgctggatcagttgctcaggcacgtgatgaacctctggaaacctctcaataactaactgcc
ggcttccggaaggggatgtgatgcatctgtcccagagctccagcgtcagtcagtaagtgtcctgagctt
aagtggggtcagctgacagatgtaagtcagcagcctcctcaagctctgctggagagagcctctgccacc
ctccaggacctggctcttgatgagtggtggatcacggatgatcagctccttgcctcctgccttccctga
gccactgctcccagcttaaaccttaagctctacgggaattccatctccatctctgcttgcagagctct
cctgcagcactctcgggctgagcaatctgacccacgtgctgatacctgtcccctggagagttatgag
gacatccatggtaacctccactggagaggttgcctatctgcagcaggtcagggagttgctgtgtg
agtggggcggcccagcatggctggttagtgccaacctctgctcactgtggggacagaaacctcta
tgacccggagcccatcctgtgccctgttccatgcctaac

SEQ ID NO: 8**Sequência de aminoácidos para o exemplo 4**

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPFHRHRKEDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETWERRRLWGSIQSRYISMSVWTSPPRLVEL
AGQSLKDEALAIATALELPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLKKGQHLHLETFKA
VLDGLDVELLAQEVPRRWKLVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPPEPEAAQPMTKRKRVDGLSTEAE
QPFIPVEVLVDLFLKKGACDELFSYLIKVKRKKVLRLLCCKLKI FAMPMDIKMILKMWQLDSIEDLE
VCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRRLLSHIIHASSYISPEKEBQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
RGRLDQLLRHVMPLETLSITNCRLESGDMHLSQSPSVLSVLSLGSVMLTDVSPPEPLQALLERASAT
LQDLVDFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLFSYGNISISISALQSLQLHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DINGTLHLERLAYLHARLELCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

SEQ ID NO: 9**Sequência de DNA otimizada por códon para o exemplo 3a**

atggatccaagcagccattcatcaaatatggcgaataccocaaatgaaatcagacaaaatcattattgctc
 aecgtggtgctagecgttattaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcgtttgcacaaacaggc
 tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggtcgttttagtggttattcaogatcactttta
 gatggcttgactgatgttgcgaaaaaatccccacatcgtcatcgtaaagatggcogttactatgtcatcg
 actttaccttaaaagaaattcaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacatggaacgtcgtcgtct
 gtggggcagcattcagagccgttatattagcatgagcgtgtggaccagcccgcgtcgtctggttgagctg
 gccggccagagcctgctgaaagatgaaagcgtggtccattgcccgcgtggagctgctgccgcgtgagctgt
 tcccgccgctgtttatggcggcgtttgatggcgtcatagccagaccctgaaagcgtggtgcaggcgtg
 gccgtttacctgctcggcgtggcgtgctgatgaaagccagcatctgcattcggaaaactttaaagcg
 gtgctggatggcctggtgctgctgctggccaggaagtctcgcgcgtcgttggaaaactgcaagtgctgg
 atctgcgtaaaaacagccatcaggatttttggaccgtgtggagcggcaatcgtgagcctgtatagctt
 tccggaaccggaagcggcgcagccgatgaccaaaaaacgtaagtggtggcctgagcaccgaaagcggaa
 cagccgtttatccgggtggaagtgctggttgacctgttctgaaagaaggcgcctgcgacgagctgttta
 gctactctgatcgaaaagtgaaacgcacaaaaaacgtgctgctcgtgctgcaaaaaactgaaaactctt
 cgcgatgcccagtgacaggatattaaaatgatcctgaaaatggtgcagctggatagcattgaggacctgga
 gtgacctgacctggaaaactgcccagccctggcacaatttagccctgctcgtggccagatgattaaactgc
 gtcgtctgctgctgctcatatctatgagcagcagctatttagccggaaaaagaagaacagtatacgc
 gcagttaccagccagtttctgagcctgcaatgcctgcaagcgtgtatgtggatagcctgtttttctg
 cgtggcctctggatcagctgctgctcatgtgatgaaatccgctggaaacccctgagcattaccaactgcc
 gctcagcgaaggcgtgctgatgcatctgagccagagcccagcgttagccagctgtctgtctgagcct
 gagcggcgtgatgctgaccgatgtgagcccgaaccgctgcaagcctgctggaacgtgagcgcgcaacc
 ctgcaagacctggtgtttgatgaatgcggcataccgatgatacagctgctggccctgctgcccagcctga
 gccatgacagccagctgaccacctgagctttatggcaacagcattagcattagcgcgctgcaagcct
 gctgcaacatctgatggcctgagcaacctgaccatgtgctgtatccgggtgccgctggaaagctatgaa
 gatattcatggcaccctgcatctggaacgtctggcctatctgacgcgcgtctgctgagctgctgtgcg
 agctgggcccgtccgagcaggtttggctgctgcaaatccgtgccgcattgcccgcgacgtacctttta
 tgatccggaaccgatctctgctgcccgtgctttatgcccgaaccaccaccaccaccaccacc

SEQ ID NO: 10**Sequência de aminoácidos para o exemplo 3a**

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAPAQQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
 DGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLNGSIQSRYSMSVWTSRRRLVEL
 AGQSLLKDEALAAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPPTCLPLGVLMKQHLHLET FKA
 VLDGLDVLQAQEVRRRWKLVLDLRKNSHQDFWTWVSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKRKRVDGLSTEAE
 QPFIPEVVLVDLPLKKGACDELFSYLIKVKRKKNVLRCCRKLKIFAMPMDIKMILKMWQLDSIEDLE
 VTCTWKLPTLAKFSPYLQGMINLRRLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLPLPL
 RGRDLQLLRHVMNPLETLSITNCRLESGDVMHLSQSPSVSLSVLSLSGVMLTDVSPPELQALLERASAT
 LQDLVDFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSSISALQSLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
 DIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNHHHHHH

SEQ ID NO: 11**Sequência de DNA otimizada por códon para o exemplo 4a**

atggatccaagcagccatcctcaaatatggcgaatacccaaatgaaatcagacaaaatcattatgtctc
 accgtgggtgctagcgggttattaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcgtttgcacaacaggc
 tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatgggtcgttagtggttattcacgatcaactttta
 gatggcttgaactgagtgtgcgaaaaaatcccacatcgtcatcgttaaagatggcggttactatgtcatcg
 actttaccttaaaagaaatccaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacatggaaocgtcgtcgtc
 gtggggcagcattcagagccggttatattagcatgagcgtgtggaccagcccgctcgtctggttgagctg
 gccggccagagcctgctgaaagatgaagcgtggccattgcggcgttgagctgctgccgctgagctgt
 tccgcgcgtgtttatggcggcgtttgatggcgtcatagccagaccctgaaagcagtggtgcagggcgtg
 gccgtttacctgtctgccgctggcgtgctgtagaaaggccagcatctgcatctggaacaccttaaaagcg
 gtgctggatggcctggatgtgctgctggcccaggaagtctgcgcgtcgttgaaactgcaagtgtggtg
 atctgctgtaaaaacagccatcaggattttggaccgtgtggagcggcaatcgtgtagcctgtatagctt
 tccggaaccggaagcggcgcagccgatgacaaaaaacgtaaagtggatggcctgagcaccgaaagcggaa
 cggcgtttattccgggtggaagtgtggtgtaacctgtttctgaaagaaggcgcctgcgacgagctgttta
 gctatctgatcgaaaaagtgaaaacgcaaaaaaacgtgctgctgctgctgcaaaaaactgaaaaactt
 cgcgatgccgatgcaggatattaaatgatcctgaaaatggtgacagctggatagcattgaggacctgga
 gtgacctgcaacctggaactgcgacccctggcacaatttagcccgatctgggcaagatgattaacctgc
 gtcgtctgctgctgctcatattcatgtagcagcctatattagccggaaaaagaagaacagtatatcgc
 gcagttaccagccagttctgtagcctgcaatgcctgcaagcgtgtatgtggatagcctgtttttctg
 cgtggcgtctggatcagctgctgctgctcaagtgtgaaatccgctggaaaccctgagcattaccaactgcc
 gtctgagcgaaggcgtatgtgtagcatctgagccagagcccgagcgttagccagctgtctgtctgagcct
 gagcggcgtgtagctgaccgatgtgagcccggaaccgctgcaagccctgctggaacgtgcgagcgcgacc
 ctgcaagacctgggtgtttgatgaaatgcggcattaccgatgatcagctgctggcctgctgccgagcctga
 gccatgtagcagcagctgaccacctgagctttatggcaacagcattagcattagcgcgctgcaagcct
 gctgcaacatctgatggcctgagcaacctgaccatgtgctgtatccgggtgcgctggaaagctatgaa
 gatattcatggcaccctgcatctggaacgtctggcctatctgcaagcgcgtctgctgtagctgctgctg
 agctgggcccgtccgagcatggtttggcgtctgctgcaatccgtgcccgcattgcccggatcgtacctttat
 tgatccggaaccgatctctgtagccgtgtttatgccgaac

SEQ ID NO 12**Sequência de aminoácidos para o exemplo 4^a**

MDPSSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLDQDLAMTFDORLVVIHDHFL
 DGLTDVAKKFPFHRHRKDCRYVVIDFTLKEIQSLENTENFETMRRLWGSIQSRYISMSVWTSPRRLVEL
 AGQSLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFCLPLGLVLMKGQHLHLETFKA
 VLDGLDVLDAQEVRPRRWKLQVLDLRKNSHQDPWTWVSGNRASLYSPPEPEAAQPMTKRKVDGLSTEAE
 QPFIPEVVLVDLFLKEGACDELFSYLIKVKRKKNVLRLLCCKLKI PAMPMDIKMILKMLVQLDSIEDLE
 VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHINASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
 RGRLDQLLRHVMPLETLSITNCRLESGDVMHLSQSPSVLSLSVLSLSGVMLTDVSPPEPLQALLERASAT
 LQDLVDFEBCGITDDQLLALLPSSLHSCSLTTLSTFYGNSISISALQSLQLHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
 DIHGTLHLERLAYLHARLRELLCBLGRPSMVWLSANPCPHCCDRTFYDPEPILCPCFMPN

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> GlaxoSmithKline Biologicals SA

<120> Vacina

<130> VB62293

<150> 0700760.2

<151> 2007-01-15

<150> 0701262.8

<151> 2007-01-23

<160> 45

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1887

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - proteína D - PRAME - TSGHHHHHH
(plasmídeo TCMP14)

<400> 1

```

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaatacc ccaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtgggtc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacagge tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggg 180
cgttttagtgg ttattcaaga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagttagt aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcgttt gtggggttcc 360
attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420
gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgccc 480
agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgctccctc tgggagtgtc gatgaagggg 600
caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt getccttgcc 660
caggagggtc gcccagggag gtgaaaactt caagtgtgtg atttacggaa gaactctcat 720
caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840

```

cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgta gacctgttcc tcaaggaagg tgcctgtgat 900
 gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
 tgtaagaagc tgaagatfff tgcaatgcc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 1020
 gtgcagctgg actctattga agatttggaa gtgacttgta cctggaagct acccaecttg 1080
 gogaaaatfff ctcttacct gggccagatg attaatctgc gtgactcct cctctccac 1140
 atccatgcat ettcctacat ttccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 1200
 tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt atttttcctt 1260
 agagggccgc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaac cctctcaata 1320
 actaactgcc ggctctcgga aggggatgtg atgcatctgt ccagagctcc cagcgtcagt 1380
 cagctaagtg tcttgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagccctc 1440
 caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 1500
 atcacggatg atcagctcct tgccctcctg ccttccctga gccactgctc ccagcttaca 1560
 accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgct tgcagagtct cctgcagcac 1620
 ctcatcgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatcctg tccccctgga gagttatgag 1680
 gacatccatg gtaccctcca cctggagagc cttgcctatc tgcagccag gctcaggag 1740
 ttgctgtgtg agttggggcg gcccagcatg gtctggctta gtgccaacc ctgtctcac 1800
 tgggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatcctgt gccctgttt catgctaac 1860
 actagtggcc accatcacca tcacat 1887

<210> 2

<211> 629

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - TSGMHHHHH

(plasmídeo TCMP14)

<400> 2

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25						30	
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
			35				40						45		
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
			50				55					60			
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
65					70					75					80
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr
					85					90					95
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Met
					100					105					110
Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Tyr	Ile	Ser	Met

	115					120							125		
Ser	Val	Trp	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Ser
	130					135							140		
Leu	Leu	Lys	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro
145					150					155				160	
Arg	Glu	Leu	Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Met	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Arg	His
				165					170					175	
Ser	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Met	Val	Gln	Ala	Trp	Pro	Phe	Thr	Cys	Leu
			180					185						190	
Pro	Leu	Gly	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Gln	His	Leu	His	Leu	Glu	Thr	Phe
	195					200							205		
Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Val	Arg
210						215						220			
Pro	Arg	Arg	Trp	Lys	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Asn	Ser	His
225				230						235				240	
Gln	Asp	Phe	Trp	Thr	Val	Trp	Ser	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser
				245				250						255	
Phe	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Gln	Pro	Met	Thr	Lys	Lys	Arg	Lys	Val
			260					265					270		
Asp	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Val
	275						280					285			
Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Cys	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser
290						295					300				
Tyr	Leu	Ile	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Arg	Leu	Cys
305				310						315				320	
Cys	Lys	Lys	Leu	Lys	Ile	Phe	Ala	Met	Pro	Met	Gln	Asp	Ile	Lys	Met
			325						330					335	
Ile	Leu	Lys	Met	Val	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Thr
			340					345						350	
Cys	Thr	Trp	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly
	355						360					365			
Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	His	Ala	Ser
	370				375						380				
Ser	Tyr	Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Gln	Phe	Thr
385				390						395				400	
Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser
			405						410					415	
Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	His	Val	Met
			420					425					430		
Asn	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly
	435						440					445			
Asp	Val	Met	His	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Ser	Val
	450				455						460				
Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Met	Leu	Thr	Asp	Val	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu

465		470		475		480
Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe						
		485		490		495
Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser						
		500		505		510
Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser						
		515		520		525
Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu						
		530		535		540
Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu						
545		550		555		560
Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala						
		565		570		575
Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp						
		580		585		590
Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp						
		595		600		605
Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn Thr Ser Gly His						
		610		615		620
His His His His His						
625						

<210> 3

<211> 1860

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - no His tail

(plasmídeo TCMP14)

<400> 3

```

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gccaatacc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgtaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcgttt gtggggttcc 360
attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420
gcagggcaga gcttctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgccc 480
agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
aaggcaatgg tgcaggcctg gccctteacc tgcctcctc tgggagtgt gatgaaggga 600
caacatcttc acctqqaqac cttcaaaqct gtqcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660

```

caggagggttc gccccaggag gtggaactt caagtgtggtg atttacggaa gaactctcat 720
 caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
 gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840
 cagcccttca ttccagtaga ggtgtctgta gacctgttcc tcaaggaagg tgctgtgat 900
 gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
 tgtaagaagc tgaagatfff tgcaatgccc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 102
 gtgcagctgg actctattga agatttggaa gtgacttgta cctggaagct acccaccttg 108
 gcgaaatfff ctccttacct gggccagatg attaactctgc gtagactcct cctctcccac 114
 atccatgcat ctctctacat ttccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 120
 tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt attttctctt 126
 agaggccgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaaac cctctcaata 132
 actaactgcc ggctttcggg aggggatgtg atgcatctgt ccagagctcc cagcgtcagt 138
 cagctaagtg tcttgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagccctc 144
 caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 150
 atcacggatg atcagctcct tgcctcctg ccttccctga gccactgctc ccagcttaca 156
 accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgctt tgcagagtct cctgcagcac 162
 ctcatcgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatcctg tccccctgga gagttatgag 168
 gacatccatg gtaccctcca cctggagagg cttgcctate tgcatgccag gctcaggag 174
 ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaaccc ctgtctcac 180
 tgtggggaca gaaccttcta tgaccéggag cccatctctgt gccctgttt catgctaac 186

<210> 4

<211> 620

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - no His tail
(plasmideo TCMP14)

<400> 4

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5				10						15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
			35					40					45		
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
			50					55				60			
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
65				70						75					80
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr
				85							90				95

Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met
 100 105 110
 Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser Met
 115 120 125
 Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser
 130 135 140
 Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg His
 165 170 175
 Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu
 180 185 190
 Pro Leu Gly Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe
 195 200 205
 Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val Arg
 210 215 220
 Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser His
 225 230 235 240
 Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser
 245 250 255
 Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala Gln Pro Met Thr Lys Lys Arg Lys Val
 260 265 270
 Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu Val
 275 280 285
 Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe Ser
 290 295 300
 Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu Cys
 305 310 315 320
 Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys Met
 325 330 335
 Ile Leu Lys Met Val Gln Leu Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr
 340 345 350
 Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly
 355 360 365
 Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser
 370 375 380
 Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr
 385 390 395 400
 Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser
 405 410 415
 Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met
 420 425 430
 Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly
 435 440 445

Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe
 485 490 495
 Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser
 515 520 525
 Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 530 535 540
 Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu
 545 550 555 560
 Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala
 565 570 575
 Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp
 580 585 590
 Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp
 595 600 605
 Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn
 610 615 620

<210> 5

<211> 1884

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - FRAME - LEHHHHHH

(plasmídeo pET21)

<400> 5

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aatgaaatc agacaaaatc 60
 attattgctc accgtgggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
 cttgcgtttg cacaaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggc 180
 cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
 ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacett aaaagaaatt 300
 caaagtttag aatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcggtt gtggggttcc 360
 attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420
 gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgcc 480
 agggagctct tcccgcact ctteatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
 aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgcctccctc tgggagtgtc gatgaagggg 600

caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660
 caggaggttc gccccaggag gtggaaactt caagtgctgg atttacggaa gaactctcat 720
 caggacttct ggactgtagt gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
 gaagcagctc agcccatgac aaagaagoga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840
 cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgta gacctgttcc tcaaggaagg tgctgtgat 900
 gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
 tgtaagaagc tgaagatfff tgcaatgccc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 1020
 gtgcagctgg actctattga agatttggaa gtgacttgta cctggaagct acccaccttg 1080
 gcgaaatfff ctcttacct gggccagatg attaactctgc gtagactcct cctctccac 1140
 atccatgcat ctccctacat ttccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 1200
 tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt attttctct 1260
 agaggccgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttgaaac cctctcaata 1320
 actaactgcc ggctttcgga aggggatgtg atgcatctgt cccagagtcc cagcgtcagt 1380
 cagctaagtg tcctgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagcccctc 1440
 caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 1500
 atcaeggatg atcagctcct tgccctcctg ccttccctga gccactgctc ccagcttaca 1560
 accttaagct tctacggaa ttccatctcc atatctgect tgcagagtct cctgcagcac 1620
 ctcatcgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatcctg tccccctgga gagttatgag 1680
 gacatccatg gtaccctcca cctggagagg cttgcctatc tgcattgccag gctcagggag 1740
 ttgctgtgtg agttggggcg gcccagcatg gtctggctta gtgccaaacc ctgtcctcac 1800
 tgtggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatcctgt gccctgttt catgcctaac 1860
 ctcgagcacc accaccacca ccac 1884

<210> 6

<211> 628

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - LBHHHHHH

(plasmídeo pET21)

<400> 6

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5				10					15		
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
		20						25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
		35					40					45			
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
		50				55					60				
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
65				70						75				80	
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr

		85						90						95		
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Met	
		100						105					110			
Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Tyr	Ile	Ser	Met	
		115						120					125			
Ser	Val	Trp	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Ser	
		130						135					140			
Leu	Leu	Lys	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	
		145						150				155			160	
Arg	Glu	Leu	Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Met	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Arg	His	
								165						170	175	
Ser	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Met	Val	Gln	Ala	Trp	Pro	Phe	Thr	Cys	Leu	
								180						185	190	
Pro	Leu	Gly	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Gln	His	Leu	His	Leu	Glu	Thr	Phe	
								195						200	205	
Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Val	Arg	
								210						215	220	
Pro	Arg	Arg	Trp	Lys	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Asn	Ser	His	
								225						230	235	240
Gln	Asp	Phe	Trp	Thr	Val	Trp	Ser	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	
								245						250	255	
Phe	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Gln	Pro	Met	Thr	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	
								260						265	270	
Asp	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Val	
								275						280	285	
Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Cys	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser	
								290						295	300	
Tyr	Leu	Ile	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Arg	Leu	Cys	
								305						310	315	320
Cys	Lys	Lys	Leu	Lys	Ile	Phe	Ala	Met	Pro	Met	Gln	Asp	Ile	Lys	Met	
								325						330	335	
Ile	Leu	Lys	Met	Val	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Thr	
								340						345	350	
Cys	Thr	Trp	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	
								355						360	365	
Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	His	Ala	Ser	
								370						375	380	
Ser	Tyr	Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Gln	Phe	Thr	
								385						390	395	400
Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser	
								405						410	415	
Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	His	Val	Met	
								420						425	430	
Asn	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly	

435		440		445
Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val				
450		455		460
Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu				
465		470		480
Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe				
	485		490	495
Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser				
	500		505	510
Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser				
	515		520	525
Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu				
	530		535	540
Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu				
	545		550	555
Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala				
	565		570	575
Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp				
	580		585	590
Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp				
	595		600	605
Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn Leu Glu His His				
	610		615	620
His His His His				
625				

<210> 7

<211> 1860

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - no His tail
(plasmídeo pET21)

<400> 7

```

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaatcccc aatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggg 180
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggcggttac tatgtcatcg accttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcgttt gtggggttcc 360
attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420

```

gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgccc 480
 agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
 aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgccctccctc tgggagtget gatgaagggg 600
 caacatcttc acctgggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660
 caggaggttc gccccaggag gtggaaactt caagtgettg atttacggaa gaactctcat 720
 caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
 gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagttagatg gtttgagcac agaggcagag 840
 cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgtg gacctgttcc tcaaggaagg tgcctgtgat 900
 gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
 tgtaagaagc tgaagatttt tgcaatgcc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 102
 gtgcagctgg actctattga agatttggaa gtgacttgta cctggaaget acccaccctg 108
 gcgaaatfff ctccttacct gggccagatg attaatctgc gtagactcct cctctccac 114
 atccatgcat cttcctacat tccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 120
 tctcagttcc tcagctgca gtgectgcag gctctctatg tggactcttt attttctct 126
 agaggccgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaac cctctcaata 132
 actaactgcc ggctttcggg aggggatgtg atgcatctgt ccagagctc cagcgtcagt 138
 cagctaagtg tccctgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagccctc 144
 caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 150
 atcacggatg atcagctcct tgccctcctg ccttcctga gccactgctc ccagcttaca 156
 accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgcct tgcagagtct cctgcagcac 162
 ctcatcgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatctg tccccctgga gagttatgag 168
 gacatccatg gtaccctcca cctggagagg cttgcctatc tgcatgccag gctcaggag 174
 ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaaacc ctgtcctcac 180
 tgtggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatcctgt gccctgttt catgcctaac 186

<210> 8

<211> 620

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - no His tail
 (plasmídeo pET21)

<400> 8

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5				10					15		
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
			35					40					45		
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
			50					55					60		

Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe			
65	70	75	80
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr			
	85	90	95
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met			
	100	105	110
Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser Met			
	115	120	125
Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser			
	130	135	140
Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro			
145	150	155	160
Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg His			
	165	170	175
Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu			
	180	185	190
Pro Leu Gly Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe			
	195	200	205
Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val Arg			
	210	215	220
Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser His			
225	230	235	240
Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser			
	245	250	255
Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala Gln Pro Met Thr Lys Lys Arg Lys Val			
	260	265	270
Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu Val			
	275	280	285
Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe Ser			
	290	295	300
Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu Cys			
305	310	315	320
Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys Met			
	325	330	335
Ile Leu Lys Met Val Gln Leu Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr			
	340	345	350
Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly			
	355	360	365
Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser			
	370	375	380
Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr			
385	390	395	400
Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser			
	405	410	415

Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met
 420 425 430
 Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly
 435 440 445
 Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe
 485 490 495
 Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser
 515 520 525
 Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 530 535 540
 Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu
 545 550 555 560
 Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala
 565 570 575
 Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp
 580 585 590
 Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp
 595 600 605
 Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn
 610 615 620

<210> 9

<211> 1878

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - HHHHHH (plasmídeo pET26)

<400> 9

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaatacco aaatgaaatc agacaaaatc 60
 attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
 cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
 cgttttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggccttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
 ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacett aaaagaaatt 300
 caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gtcgctgtct gtggggcagc 360

attcagagcc gttatattag catgagcgtg tggaccagcc cgcgtcgtct ggttgagctg 420
 gccggccaga gcctgctgaa agatgaagcg ctggccattg cggcgtgga gctgctgccg 480
 cgtgagctgt ttccgccgct gtttatggcg gcgtttgatg gccgtcatag ccagaccctg 540
 aaagcgatgg tgcagggctg gccgtttacc tgtctgccgc tgggctgct gatgaaaggc 600
 cagcatctgc atctggaaac ctttaaagcg gtgctggatg gcctggatgt gctgctggcc 660
 caggaagttc gtccgcgtcg ttggaaactg caagtgctgg atctgcgtaa aaacagccat 720
 caggatTTTT ggaccgtgtg gagcggcaat cgtgcgagcc tgtatagctt tccggaaccg 780
 gaagcggcgc agccgatgac caaaaaacgt aaagtggatg gcctgagcac cgaagcggaa 840
 cagccgttta ttccgggtga agtgcgtggt gacctgttcc tgaagaagg cgccctgcgac 900
 gagctgttta gctatctgat cgaaaaagtg aaacgcaaaa aaaacgtgct gcgtctgtgc 960
 tgcaaaaaac tgaaaatctt cgcgatgccg atgcaggata ttaaatgat cctgaaaaatg 1020
 gtgcagctgg atagcattga ggacctggaa gtgacctgca cctggaaact gccgaccctg 1080
 gccaaattta gcccgatctt gggccagatg attaacctgc gtcgtctgct gctgtctcat 1140
 attcatgcga gcagctatat tagcccgaa aaagaagaac agtatatcgc gcagtttacc 1200
 agccagtttc tgagcctgca atgcctgcaa gcgctgtatg tggatagcct gttttttctg 1260
 cgtggccgctc tggatcagct gctgcgtcat gtgatgaatc cgctggaaac cctgagcatt 1320
 accaactgcc gtctgagcga aggcgatgtg atgcatctga gccagagccc gagcgttagc 1380
 cagctgtctg ttctgagcct gagcggcgtg atgctgaccg atgtgagccc ggaaccgctg 1440
 caagccctgc tggaaactgc gagcgcgacc ctgcaagacc tgggtgttga tgaatgcggc 1500
 attaccgatg atcagctgct ggccctgctg ccgagcctga gccattgcag ccagctgacc 1560
 acctgagct tttatggcaa cagcattagc attagcgcgc tgcaaagcct gctgcaacat 1620
 ctgattggcc tgagcaacct gacctatgtg ctgtatccgg tgccgctgga aagctatgaa 1680
 gatattcatg gcacctgca tctggaacgt ctggcctatc tgcacgcgcg tctgcgtgag 1740
 ctgctgtgcg agctgggccc tccgagcatg gtttggtgt ctgcgaatcc gtgcccgcat 1800
 tgcggcgatc gtaccttta tgatccggaa ccgattctgt gcccgctctt tatgccgaac 1860
 caccaccacc accaccac 1878

<210> 10

<211> 626

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D PRAME - HHHHHH (plasmídeo pET26)

<400> 10

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
			35					40					45		
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val

50						55										60
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe	
65						70				75						80
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr	
						85				90						95
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Met	
						100				105						110
Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Tyr	Ile	Ser	Met	
						115				120						125
Ser	Val	Trp	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Ser	
						130										140
Leu	Leu	Lys	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	
145						150										160
Arg	Glu	Leu	Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Met	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Arg	His	
						165										175
Ser	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Met	Val	Gln	Ala	Trp	Pro	Phe	Thr	Cys	Leu	
						180										190
Pro	Leu	Gly	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Gln	His	Leu	His	Leu	Glu	Thr	Phe	
						195										205
Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Val	Arg	
						210										220
Pro	Arg	Arg	Trp	Lys	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Asn	Ser	His	
225						230										240
Gln	Asp	Phe	Trp	Thr	Val	Trp	Ser	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	
						245										255
Phe	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Gln	Pro	Met	Thr	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	
						260										270
Asp	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Val	
						275										285
Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Cys	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser	
						290										300
Tyr	Leu	Ile	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Arg	Leu	Cys	
305						310										320
Cys	Lys	Lys	Leu	Lys	Ile	Phe	Ala	Met	Pro	Met	Gln	Asp	Ile	Lys	Met	
						325										335
Ile	Leu	Lys	Met	Val	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Thr	
						340										350
Cys	Thr	Trp	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	
						355										365
Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	His	Ala	Ser	
						370										380
Ser	Tyr	Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Gln	Phe	Thr	
385						390										400
Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser	

			405						410						415
Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	His	Val	Met
			420						425						430
Asn	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly
			435						440						445
Asp	Val	Met	His	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Ser	Val
			450						455						460
Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Met	Leu	Thr	Asp	Val	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu
			465				470				475				480
Gln	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ala	Ser	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Leu	Val	Phe
			485								490				495
Asp	Glu	Cys	Gly	Ile	Thr	Asp	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser
			500						505						510
Leu	Ser	His	Cys	Ser	Gln	Leu	Thr	Thr	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser
			515						520						525
Ile	Ser	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gln	His	Leu	Ile	Gly	Leu
			530						535						540
Ser	Asn	Leu	Thr	His	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ser	Tyr	Glu
			545				550				555				560
Asp	Ile	His	Gly	Thr	Leu	His	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Leu	His	Ala
			565								570				575
Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Gly	Arg	Pro	Ser	Met	Val	Trp
			580								585				590
Leu	Ser	Ala	Asn	Pro	Cys	Pro	His	Cys	Gly	Asp	Arg	Thr	Phe	Tyr	Asp
			595						600						605
Pro	Glu	Pro	Ile	Leu	Cys	Pro	Cys	Phe	Met	Pro	Asn	His	His	His	His
			610						615						620
His	His														
			625												

<210> 11

<211> 1860

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sem cauda de His
(plasmídeo pET26)

<400> 11

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaatacc ccaaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180

cgtttagtgg ttattcacga tcaactttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
 ccacatcgtc atcgtaaaga tggecgttac tatgtcatcg actttacett aaaagaaatt 300
 caaagttagt aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gtcgtcgtct gtggggcagc 360
 attcagagcc gttatattag catgagcgtg tggaccagcc cgcgtcgtct ggttgagctg 420
 gccggccaga gcctgctgaa agatgaagcg ctggccattg cggcgctgga gctgctgccg 480
 cgtgagctgt ttccgcccgt gtttatggcg gcgtttgatg gccgtcatag ccagaccctg 540
 aaagcgatgg tgcaggcgtg gccgtttacc tgtctgccc tgggocgtct gatgaaagc 600
 cagcatctgc atctggaaac ctttaaagcg gtgctggatg gcctggatgt gctgctggcc 660
 caggaagttc gtccgctcg ttggaactg caagtgtg atctgcgtaa aaacagccat 720
 caggatttt ggaccgtgtg gagcggcaat cgtgcgagcc tgtatagctt tccggaaccg 780
 gaagcggcgc agccgatgac caaaaaagc aaagtggatg gcctgagcac cgaagcggaa 840
 cagccgttta ttccggtgga agtgcgtggt gacctgttc tgaagaagg cgcctgcgac 900
 gagctgttta gctatctgat cgaaaaagtg aaacgcaaaa aaaacgtgct gcgtctgtgc 960
 tgcaaaaaac tgaaaatctt cgcgatgccg atgcaggata ttaaaatgat cctgaaaatg 1020
 gtgcagctgg atagcattga ggacctgaa gtgacctgca cctggaaact gccgaccctg 1080
 gccaaattha gcccgatctt gggccagatg ataacctgc gtcgtctgct gctgtctcat 1140
 attcatgcca gcagctatat tagcccggaa aaagaagaac agtatatcgc gcagtttacc 1200
 agccagttc tgagcctgca atgcctgcaa gcgctgtatg tggatagcct gtttttctg 1260
 cgtggccgtc tggatcagct gctgcgtcat gtgatgaatc cgcctgaaac cctgagcatt 1320
 accaactgcc gtctgagcga aggcgatgtg atgcatctga gccagagccc gagcgttagc 1380
 cagctgtctg ttctgagcct gagcggcgtg atgctgaccg atgtgagccc ggaaccgctg 1440
 caagccctgc tggaaagctg gagcgcgacc ctgcaagacc tgggtgttga tgaatgccc 1500
 attacgatg atcagctgct ggccctgctg ccgagcctga gccattgcag ccagctgacc 1560
 accctgagct tttatggcaa cagcattagc attagcgcgc tgcaaagcct gctgcaacat 1620
 ctgattggcc tgagcaacct gaccatgtg ctgtatccgg tgccgctgga aagetatgaa 1680
 gatattcatg gcaccctgca tctggaacgt ctggcctatc tgcacgcgcg tctgcgtgag 1740
 ctgctgtgcg agctgggccc tccgagcatg gtttggctgt ctgcgaatcc gtgcccgc 1800
 tgcggcgatc gtacctttta tgatccggaa ccgattctgt gcccgctctt tatgccgaac 1860

<210> 12

<211> 620

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sem cauda de His
(plasmídeo pET26)

<400> 12

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25					30		

Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
 35 40 45
 Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
 50 55 60
 Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
 65 70 75 80
 Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met
 100 105 110
 Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser Met
 115 120 125
 Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser
 130 135 140
 Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg His
 165 170 175
 Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu
 180 185 190
 Pro Leu Gly Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe
 195 200 205
 Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val Arg
 210 215 220
 Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser His
 225 230 235 240
 Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser
 245 250 255
 Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala Gln Pro Met Thr Lys Lys Arg Lys Val
 260 265 270
 Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu Val
 275 280 285
 Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe Ser
 290 295 300
 Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu Cys
 305 310 315 320
 Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys Met
 325 330 335
 Ile Leu Lys Met Val Gln Leu Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr
 340 345 350
 Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly
 355 360 365
 Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser
 370 375 380

Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr
 385 390 395 400
 Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser
 405 410 415
 Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met
 420 425 430
 Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly
 435 440 445
 Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe
 485 490 495
 Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser
 515 520 525
 Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 530 535 540
 Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu
 545 550 555 560
 Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala
 565 570 575
 Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp
 580 585 590
 Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp
 595 600 605
 Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn
 610 615 620

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu

1

5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Leu Tyr Ser Phe Pro Glu Pro Glu Ala
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
1 5

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo CAN008 de sentido**<400> 18**

atataacata tggatccaag cagccattca tcaaat

36

<210> 19**<211> 40****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> antisense oligonucleotide CAN037****<400> 19**

ccacaaacgc cttegtcca tggtttcaaa gttttctgtc

40

<210> 20**<211> 40****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN036 de sentido****<400> 20**

gacagaaaac ttgaaacca tggaaacgaag gcgtttgtgg

40

<210> 21**<211> 39****<212> DNA****<213>****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN029 anti-sentido****<400> 21**

agagagacta gtctagttag gcatgaaaca ggggcacag

39

<210> 22**<211> 36****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>**

<223> Oligonucleotídeo anti-sentido CAN002

<400> 22

ggaggaacta gtgttaggca tgaaacaggg gcacag 36

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo CAN040 de sentido

<400> 23

agagagcata tgagcagcca ttcacaaat atggcg 36

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo CAN032 anti-sentido

<400> 24

acgtggggcg cgcgggttc aaagttttct gtcatttcta a 41

<210> 25

<211> 39

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo CAN033 de sentido

<400> 25

ttgttggcgg ccgcaatgga acgaaggcgt ttgtggggt 39

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo CAN034 anti-sentido**<400> 26**

ggaggactcg aggttaggca tgaaacaggg gcacag 36

<210> 27**<211> 39****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN035 anti-sentido****<400> 27**

ggaggactcg agctagttag gcatgaaaca ggggcacag 39

<210> 28**<211> 31****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN106 de sentido****<400> 28**

cagaaaactt tgaaacctatg gaacgaaggc g 31

<210> 29**<211> 31****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN107 anti-sentido****<400> 29**

cgcttcggtt ccatggtttc aaagttttct g 31

<210> 30**<211> 43****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>**

<223> Oligonucleotídeo CAN104 de sentido**<400> 30**

ggagatatac atatggatcc aagcagccat tcatcaaata tgg 43

<210> 31**<211> 43****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220> Oligonucleotídeo CAN105 anti-sentido****<223> Sequência Artificial****<400> 31**

ccatatttga tgaatggctg ctggatcca tatgtatata tcc 43

<210> 32**<211> 40****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN123 de sentido****<400> 32**

gacagaaaac tttgaaacca tggaacgtcg tcgtctgtgg 40

<210> 33**<211> 40****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CAN124 anti-sentido****<400> 33**

ccacagacga cgacgttcca tggtttcaaa gttttctgtc 40

<210> 34**<211> 30****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>**

<223> **Oligonucleotídeo CAN199 de sentido**

<400> 34

ggaattccat atggatccaa gcagccattc 30

<210> 35

<211> 53

<212> DNA

<213> **Sequência Artificial**

<220>

<223> **Oligonucleotídeo CAN19 anti-sentido**

<400> 35

ggagctctcg agtcagtggg ggtggtggtg gtggttcggc ataaagcacg ggc 53

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> **Sequência Artificial**

<220>

<223> **Oligonucleotídeo CpG 1826 imunoestimulatório**

<400> 36

tccatgacgt tectgacgtt 20

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> **Sequência Artificial**

<220>

<223> **Oligonucleotídeo CpG 1758 imunoestimulatório**

<400> 37

tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 38

<211> 54

<212> DNA

<213> **Sequência Artificial**

<220>

<223> Oligonucleotídeo CpG2006 imunoestimulatório**<400> 38**

accgatgacg tcgccgggta eggcaccacg tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 54

<210> 39**<211> 20****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CpG1668 imunoestimulatório****<400> 39**

tccatgacgt tectgatgct 20

<210> 40**<211> 22****<212> DNA****<213> Sequência Artificial****<220>****<223> Oligonucleotídeo CpG5456 imunoestimulatório****<400> 40**

tcgacgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 41**<211> 127****<212> PRT****<213> Haemophilus influenzae b****<400> 41**

Met Lys Leu Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu
 1 5 10 15
 Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
 20 25 30
 Ser Asp Lys Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
 35 40 45
 Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
 50 55 60
 Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
 65 70 75 80
 Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe

				85						90					95			
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr			
			100					105					110					
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr				
			115				120						125					

<210> 42

<211> 111

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> 1-Met; 2-Asp; 3-Pro; seguido por AA 20 a 127 de proteína D

<400> 42

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys			
1				5					10					15				
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro			
			20					25					30					
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp			
		35				40						45						
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val			
	50				55					60								
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe			
65				70					75					80				
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr			
				85					90					95				
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr				
			100				105						110					

<210> 43

<211> 450

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Proteína D -MAGE-A3-His

<400> 43

Met	Asp	Pro	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Leu			
1				5					10					15				

Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
 20 25 30
 Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
 35 40 45
 Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
 50 55 60
 Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
 65 70 75 80
 Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
 85 90 95
 Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met
 115 120 125
 Asp Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu Glu
 130 135 140
 Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala Thr
 145 150 155 160
 Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val Thr
 165 170 175
 Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro Gln Ser Pro
 180 185 190
 Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu Trp Ser
 195 200 205
 Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr
 210 215 220
 Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser Arg Lys Val
 225 230 235 240
 Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro
 245 250 255
 Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn Trp Gln Tyr
 260 265 270
 Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gln Leu Val
 275 280 285
 Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr Ile
 290 295 300
 Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn
 305 310 315 320
 Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile
 325 330 335
 Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu Leu
 340 345 350
 Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly Asp
 355 360 365

Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu
 370 375 380
 Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu Trp
 385 390 395 400
 Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His His
 405 410 415
 Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu His
 420 425 430
 Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His His His His
 435 440 445
 His His
 450

<210> 44

<211> 109

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> o aa da proteína D de *Haemophilus influenzae*
 para uso em uma sequência pD1/3-PRAME-His

<400> 44

Met Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys Ser Asp
 1 5 10 15
 Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Glu His
 20 25 30
 Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp Tyr Leu
 35 40 45
 Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val Ile His
 50 55 60
 Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro His
 65 70 75 80
 Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr Leu Lys
 85 90 95
 Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr
 100 105

<210> 45

<211> 127

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> o aa da proteína D de Haemophilus influenzae
para uso em uma sequência pDI3-MAGE-His

<400> 45

```

Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu
 1                5                10                15
Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
      20                25                30
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
      35                40                45
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
      50                55                60
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
65                70                75                80
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
      85                90                95
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
      100                105                110
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr
      115                120                125

```

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) PRAME ou um fragmento imunogênico do mesmo, e

5 (b) um parceiro de fusão heterólogo proteína derivado da proteína D,

em que o dito parceiro da proteína de fusão não inclui a sequência de secreção ou sequência sinalizadora de proteína D.

10 2. Proteína de fusão parceira derivada da proteína D, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão parceira compreende aminoácidos Met-Asp-Pro em ou dentro do terminal N da sequência de proteína de fusão e em que a proteína de fusão parceira não inclui a sequência de secreção ou sequência sinalizadora de proteína D.

15 3. Proteína de fusão parceira de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a sequência de proteína D compreende ou consiste de aproximadamente ou exatamente dos aminoácidos 17 a 127, 18 a 127, 19 a 127 ou 20 a 127 de proteína D.

20 4. Proteína de fusão parceira de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que um ou mais aminoácidos da proteína de fusão parceira de proteína D são anulados ou substituídos pela substituição.

5. Proteína de fusão parceira de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que os aminoácidos são substituídos por substituições conservativas.

25 6. Proteína de fusão parceira de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizada pelo fato de que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais aminoácidos são substituídos.

7. Proteína de fusão parceira de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a sequência de

secreção ou sequência sinalizadora de proteína D refere-se aproximadamente aos aminoácidos 1 a 16, 17, 18 ou 19 da proteína de ocorrência natural.

5 8. Proteína de fusão parceira de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a secreção ou sequência sinalizadora de proteína D é o terminal N de 19 aminoácidos de proteína D.

9. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de fusão parceira como definida em qualquer uma das reivindicações de 2 a 8.

10 10. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de fusão parceira como definida em qualquer uma das reivindicações de 2 a 8 e um ou mais antígenos tumorais ou porções imunogênicas dos mesmos.

15 11. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que compreende o antígeno tumoral PRAME ou uma porção imunogênica dos mesmos.

12. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 11, caracterizada pelo fato de que o fragmento imunogênico ou porção de PRAME compreende ou consiste de um ou mais dos seguintes epítomos:

20 VLDGLDVLL (PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸; SEQ ID N°: XX);
SLYSFPEPEA (PRA¹⁴²⁻¹⁵¹; SEQ ID N°: XX);
ALYVDSLFFL (PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹; SEQ ID N°: XX);
LYVDSLFFL (PRA³⁰¹⁻³⁰⁹; SEQ ID N°: XX) e
SLLQHLLIGL (PRA⁴²⁵⁻⁴³³; SEQ ID N°: XX).

25 13. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais dos seguintes antígenos de tumor ou derivados de antígeno de tumor ou uma porção imunogênica dos mesmos: MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE

12, MAGE B1, MAGE B2, MAGE B3, MAGE B4, MAGE C1, MAGE C2.

14. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos podem ser anulados de ou substituídos na sequência de aminoácido do antígeno MAGE.

15. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que os 2 aminoácidos são anulados a partir do terminal N da sequência de MAGE.

16. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 13, 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que o antígeno é MAGE-A3 ou uma porção imunogênica do mesmo, em que o antígeno de MAGE-A3 compreende ou consiste do aminoácido 3 a 314 de MAGE-A3.

17. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o antígeno tumoral ou derivado do mesmo é selecionado de um dos seguintes antígenos ou uma porção imunogênica dos mesmos que é capaz de direcionar uma resposta imune ao antígeno: WT-1, WT-1F, BAGE, LAGE 1, LAGE 2 (também conhecido como NY-ESO-1), SAGE, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, P501S (também conhecido como prostateína), HASH1, HASH2, Cripto, B726, NYBR1.1, P510, MUC-1, Prostase, STEAP, tirosinase, telomerase, survivin, CASB616, P53 e/ou Her-2/neu, SSX-2; SSX-4; SSX-5; NA17; MELAN-A; P790; P835; B305D; B854; CASB618 (como descrito em WO00/53748); CASB7439 (como descrito em WO01/62778); C1491; C1584 e C1585.

18. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou de 9 a 17, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um rótulo de afinidade.

19. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 ou 10 a 18, caracterizada pelo fato de que, adicionalmente, compreende uma ou mais sequências ligadoras entre a

proteína de fusão parceira e o antígeno tumoral ou porção imunogênica deste e/ou entre a proteína de fusão parceira e uma cauda His ou outro rótulo de afinidade e/ou entre o antígeno tumoral ou porção imunogênica deste e uma cauda His ou outro rótulo de afinidade.

5 20. Sequência de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que codifica uma proteína de fusão ou proteína de parceiro de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 19.

 21. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de ácido nucleico como definida na reivindicação 20.

10 22. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de ser transformada com o vetor como definido na reivindicação 21.

 23. Vacina, caracterizada pelo fato de que contém uma proteína de fusão ou proteína de parceiro de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 19 ou um ácido nucleico como definido na
15 reivindicação 20 ou um vetor como definido na reivindicação 21.

 24. Vacina de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um adjuvante e/ou citocina ou quimiocina imunoestimuladoras.

 25. Vacina de acordo com a reivindicação 24, caracterizada
20 pelo fato de que o adjuvante compreende 3D-MPL, QS21 e/ou um oligonucleotídeo CpG.

 26. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações de 23 a 25, caracterizada pelo fato de que é para o uso na medicina.

 27. Uso de uma proteína ou ácido nucleico ou vetores como
25 definidos aqui, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma vacina para o tratamento imunoterapêutico de um paciente que sofre de câncer.

 28. Processo para a produção de uma proteína de fusão, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de expressar, em uma célula, uma proteína de fusão que compreende uma proteína de fusão parceira

de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8.

29. Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a célula é uma bactéria.

5 30. Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a bactéria é E. coli.

31. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 30, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão é expressada em uma célula como uma proteína insolúvel.

10 32. Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que ainda compreende a etapa de lisar a célula e purificar a proteína de fusão expressada a partir das células lisadas.

33. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que é obtida por ou obtível pelo processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 32.

15 34. Método para tratar um paciente que sofre de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administrar uma proteína, ácido nucleico, vetor ou vacina de acordo com a reivindicação aqui.

20 35. Uso de acordo com a reivindicação 27 ou o método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado de melanoma, mama, bexiga, câncer de pulmão, tal como NSCLC, sarcoma, câncer ovariano, câncer de cabeça e pescoço, câncer renal, carcinoma colorretal, mieloma múltiplo, leucemia incluindo leucemia aguda e carcinoma esofágico.

Figura 1: Análise de SDS page de 1/3PD-PRAME com ou sem cauda de His em vetor de pET21 (Exemplo/construção N° 3 e 4)

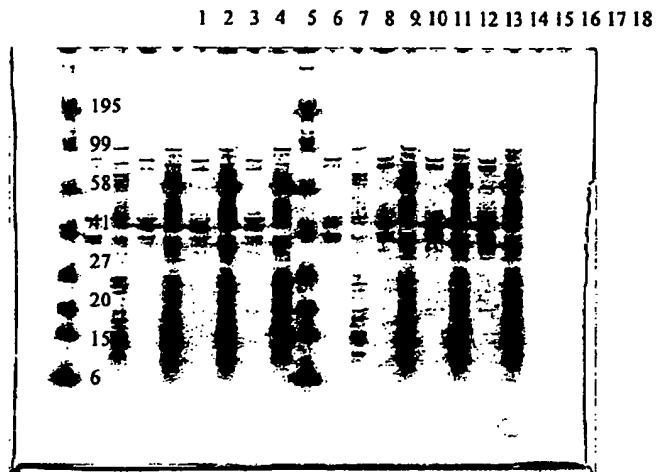


Figura 2: Análise de SDS page de códon de 1/3PD-PRAME otimizado com ou sem cauda de His em vetor de pET26 (Exemplo/construção N° 3a e 4a)

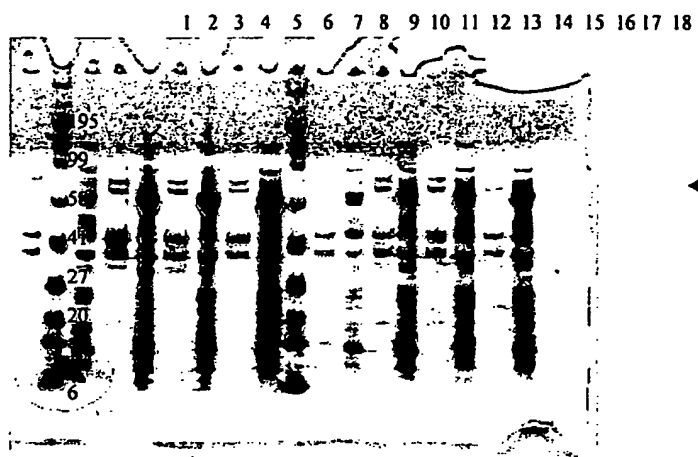


Figura 3

Resposta de CD4 (Adjuvante AS01B)

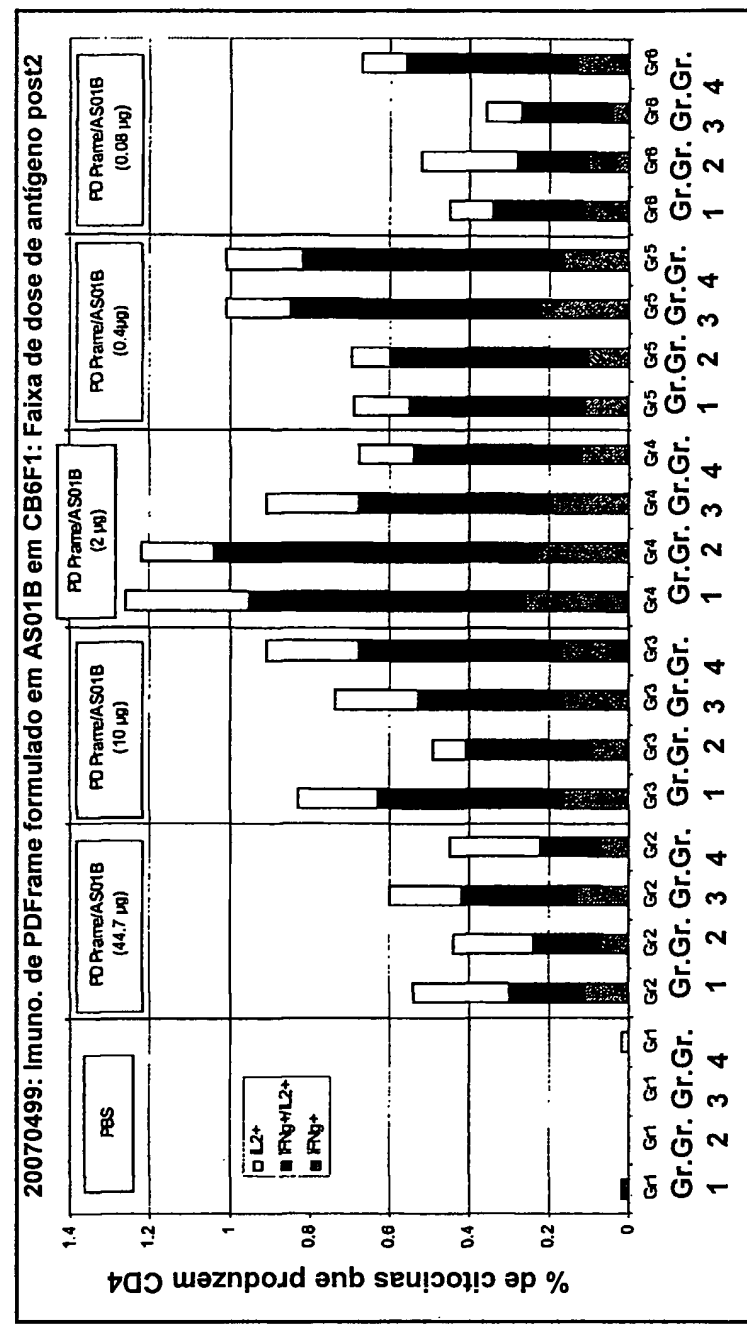


Figura 4
Resposta de CD8 (adjuvante AS01B - 20070499)

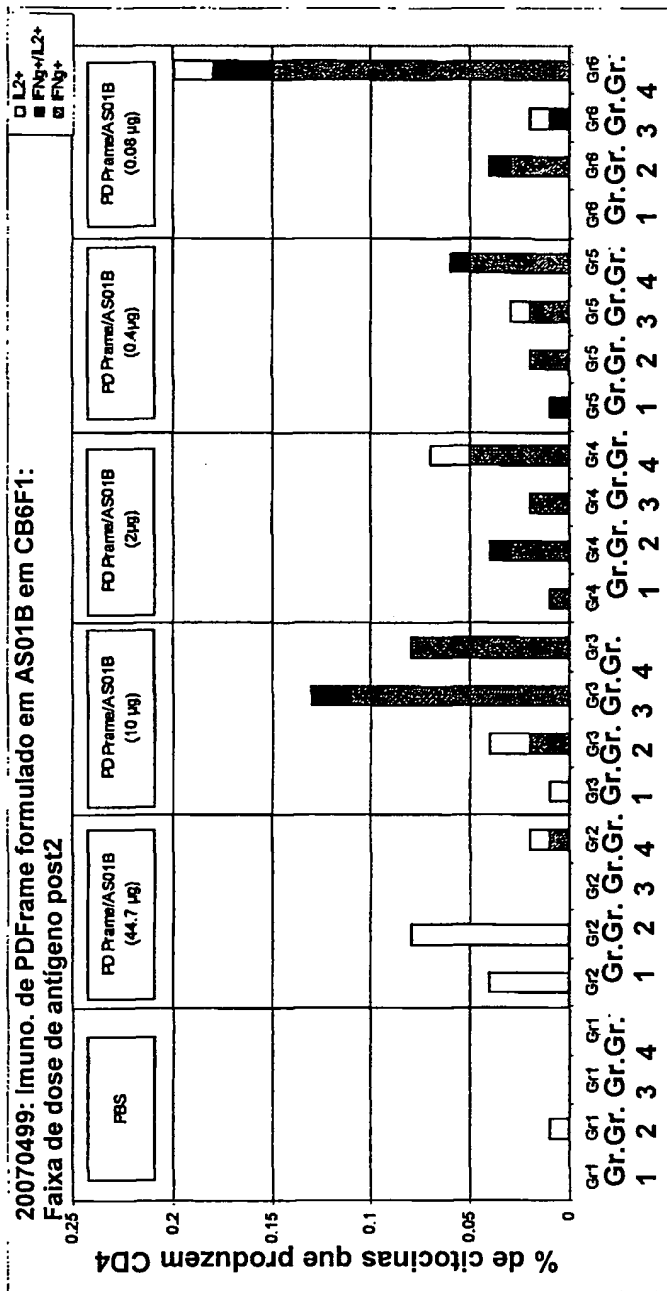


Figura 5

Resposta de CD4 (adjuvante AS15 - 20070502)

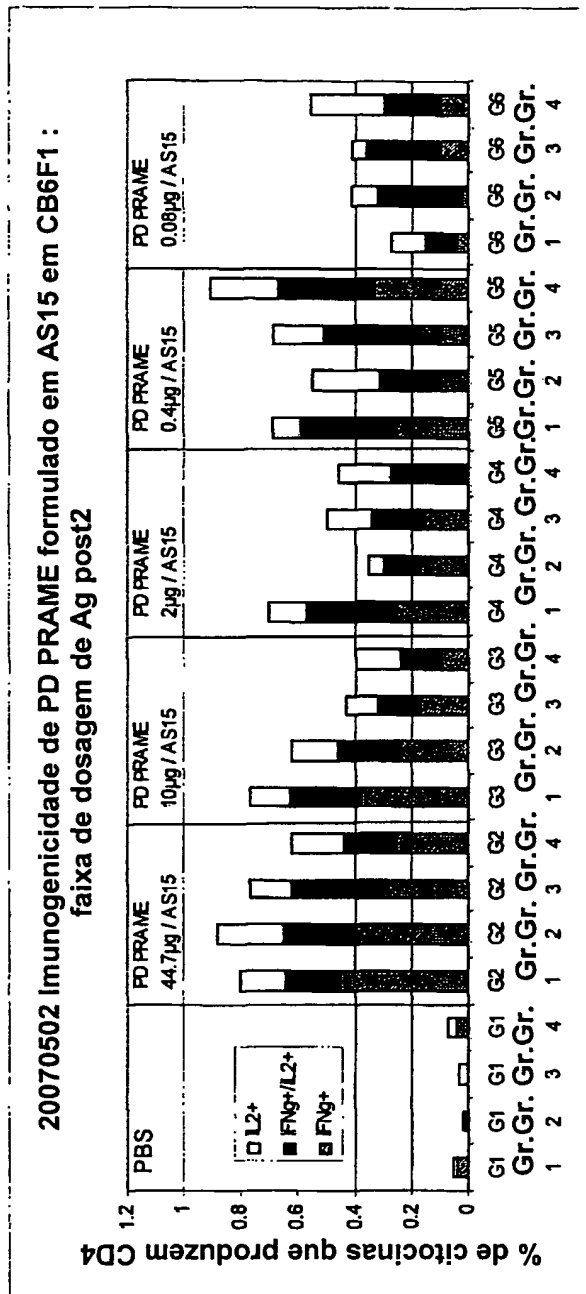


Figura 6

Resposta de CD8 (adjuvante AS15 - 20070502)

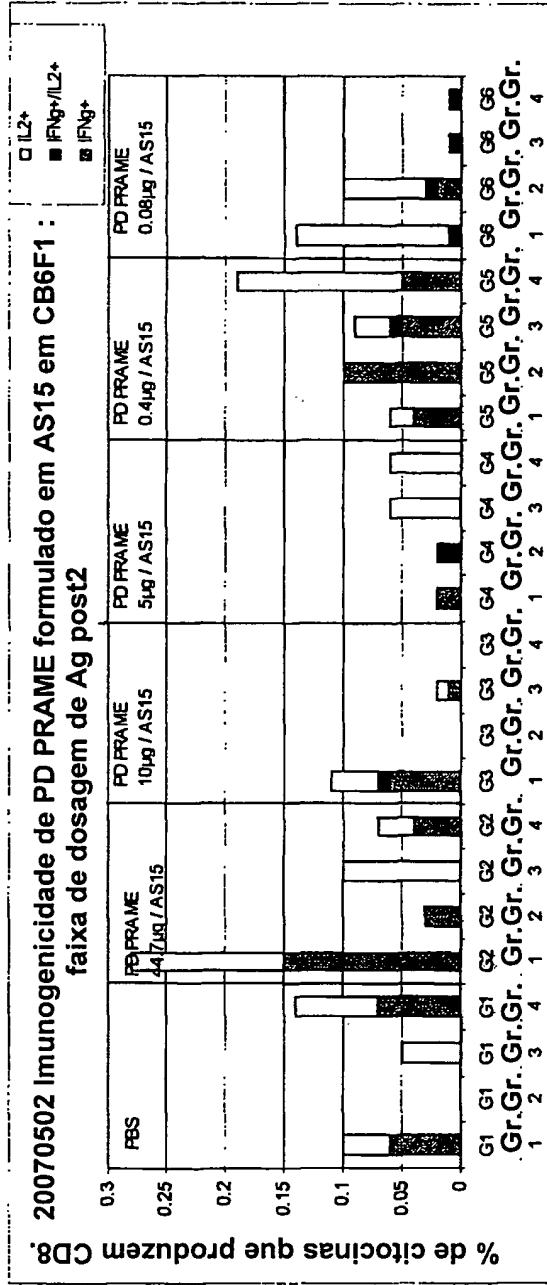


Figura 7

```

1  MDPSSHSSNM ANTQMKSDKI IIAHARGASY LPEHTLESKA LAFAQQADYL
51 EQDLAMTKDG RLVVIHDHFL DGLTDVAKKF PHHRKDGRY YVIDFTLKEI
101 QSLEMTENFE TMERRRLWGS IQSRYISMSV WTSPRRRLVEL AGSLLKDEA
151 LAIAALELLP RELFPPLFMA AFDGRHSOTL KAMVQAWPFT CLPLGVLMKG
201 QHLHLETFKA VLDGLDVLLA QEVRRRRWKL QVLDLRKNSH QDFWTVWSGN
251 RASLYSFFPEP EAAQPMTKKR KVDGLSTEAE OPFIPVEVLV DLFLKEGACD
301 ELFSYLIEKV KRKNVLRLC CKKLKIFAMP MODIKMILKM VOLDSIEDLE
351 VTCTWKLPTL AKFSPYLGOM INLRRLLLSH IHASSYISPE KEEQYIAOFT
401 SOFLSLQCLQ ALYVDSLFFL RGRLDQLLRH VMNPLETLSI TNCRLSEGDV
451 MHLSQSPSVS QLSVLSLSGV MLTDVSPEPL QALLERASAT LQDLVFDECG
501 ITDDQLLALL PSLSHCSQLT TLSFYGNSIS ISALQSLLOH LIGLSNLTHV
551 LYPVPLESYE DIHGTLHLER LAYLHARLRE LLCELGRPSM VWLSANPCPH
601 CGDRTFYDPE PILCPCFMPN (TSG) / (LE) / HHHHHH

```

Figura 7: nenhuma sequência de sinal usada para aquelas construções - preto = AA 20 a 127 de proteína D - preto - realçado = 1-Met, 2-Asp e 3-Pro - sublinhado duplo = proteína PRAME; aminoácidos 1 a 509 de PRAME (509 aminoácidos totais) preto sublinhado = 6 cauda de His com uma sequência ligadora mostrada em parênteses que variou ou que esteve presente dependendo do clone.

Figura 8

Alinhamento entre LipoD-MAGE3-His (SEQ ID N° 43) e pD1/3-PRAME His (SEQ ID N°: 10)

```

1                                     60
LipoD-MAGE3-His (1) MDPKTLALSLLAAGVLACSSHSSTMANTCMKSDYLAFAHRCASGYLEHTLESIALAF
pD1/3-PRAME-His (1) MDP-----SSHSNMANTCMKSDYLAFAHRCASGYLEHTLESIALAF
61                                     120
LipoD-MAGE3-His (61) QADYVEODLAMKCGRLVYIHDHFLDGLTDVAKRPFHRRKDCRYVLEFTLKEIQSLR
pD1/3-PRAME-His (45) QADYVEODLAMKCGRLVYIHDHFLDGLTDVAKRPFHRRKDCRYVLEFTLKEIQSLR
121                                     180
LipoD-MAGE3-His (121) HTNPFITMLE-----QRSHCKPEEGEARGEELGLVGAQAPPTEH---QZ--
pD1/3-PRAME-His (105) HTNPFITMRRRLWGSIQSRYISMSVWTSERRLELAQCQLKDESLAIALELLPRELF
181                                     240
LipoD-MAGE3-His (165) -----ASSSSIVEIT-----EG-----VPAESP
pD1/3-PRAME-His (165) PPLFMAAFDRHSQTLKAVQAWPFTCPPLGVLKMGQHLHLETFKAVLDGLVLLAQEVR
241                                     300
LipoD-MAGE3-His (188) E-----PQ--SPGASAP--TMNYP--SQSYE--QEE-----EPPSTEP
pD1/3-PRAME-His (225) ERRWKLVLDLRKNSHDFWVWGNRASLGFPEP--PMTKKRKVDGLSTEIQPFI
301                                     360
LipoD-MAGE3-His (227) DISEFQAASRKVAELHFLKIKYRAEP-----
pD1/3-PRAME-His (285) PSEVLVDFKKEGACDEFSYAEKVKKKNVRLCCKKLIKIFAMPMDIKMILKMQVLD
361                                     420
LipoD-MAGE3-His (257) -----VT-K-----A-EMEGSGNWOYFFPVVFKSSS-----LQLVIGIEL
pD1/3-PRAME-His (345) SIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGOENLRLLLSHLHSEYISPEKEEQYIAQFTSOFI
421                                     480
LipoD-MAGE3-His (295) EDPEGHLYFETCLGLSYDGLIGDNOEMKAGLLIIVLAIARGDCAPEEKIWEELSV
pD1/3-PRAME-His (405) SQQCAQVQDQLFFLRGRLDQLRHVINPLETQSTNCRSEGVVHLSQSPSVSOLS
481                                     540
LipoD-MAGE3-His (355) EDPEGREGDSLCGKELTQ-----HFVQVVEYRQVPGSDPACYEFL
pD1/3-PRAME-His (465) LSSGVMLTDSPFELQALLERASATLQDLVFDECGITDQLLALLPSLSHCSQLTTL
541                                     600
LipoD-MAGE3-His (401) GPRKVEYVKLHFKSGGPISTP-----LHEWLR
pD1/3-PRAME-His (525) YGNKSIQSISQKGNLTHLYVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARERLCE
601                                     642
LipoD-MAGE3-His (438) ESE-----E-----GGHGGG
pD1/3-PRAME-His (585) LGRPSMVWLSANPCPHCGDRFTFYDPEPILCPCFMPNRRRR

```

Figura 9

Alinhamento entre a sequência dividida da proteína D original de *Haemophilus influenzae* (SEQ ID N°: 41), o LipoD-MAGE3-His (SEQ ID N°: 45) para o uso como proteínas parceiras de fusão da presente invenção

		1	50
proteína D-H influenzae	(1)	MKLETFALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSCKIIAHRGASGYLPEH	
LipoD-MAGE3-His	(1)	MDPKTFLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSCKIIAHRGASGYLPEH	
Consenso	(1)	M KTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSCKIIAHRGASGYLPEH	
		51	100
proteína D-H influenzae	(51)	TLESKALAFQAQADYLEODLAMTKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKFERH	
LipoD-MAGE3-His	(51)	TLESKALAFQAQADYLEODLAMTKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKFERH	
Consenso	(51)	TLESKALAFQAQADYLEODLAMTKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKFERH	
		101	127
proteína D-H influenzae	(101)	RKDGYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
LipoD-MAGE3-His	(101)	RKDGYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
Consenso	(101)	RKDGYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	

Figura 10

Alinhamento entre a sequência dividida da proteína D original de Haemophilus influenzae (SEQ ID N°: 41), o LipoD-MAGE3-His (SEQ ID N°: 45) e o pD1/3-PRAME-His (SEQ ID N°: 44) para o uso como proteínas parceiras de fusão da presente invenção

		1	50
proteína D-H influenzae	(1)	MKLSKALAFACQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPRH	
LipoD-MAGE3-His	(1)	MDP...SSSSSMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
pD1/3-PRAME	(1)	-----MSSSSSNFQNTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
Consenso	(1)	M KTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
		51	100
proteína D-H influenzae	(51)	TLESKALAFACQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPRH	
LipoD-MAGE3-His	(51)	TLESKALAFACQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPRH	
pD1/3-PRAME	(33)	TLESKALAFACQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPRH	
Consenso	(51)	TLESKALAFACQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPRH	
		101	127
proteína D-H influenzae	(101)	RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
LipoD-MAGE3-His	(101)	RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
pD1/3-PRAME	(83)	RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
Consenso	(101)	RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	

Figura 11: Análise de SDS page de pD1/3-PRAME com ou sem sinal de secreção (SS) e cauda de His (His) em vetor de pET21.

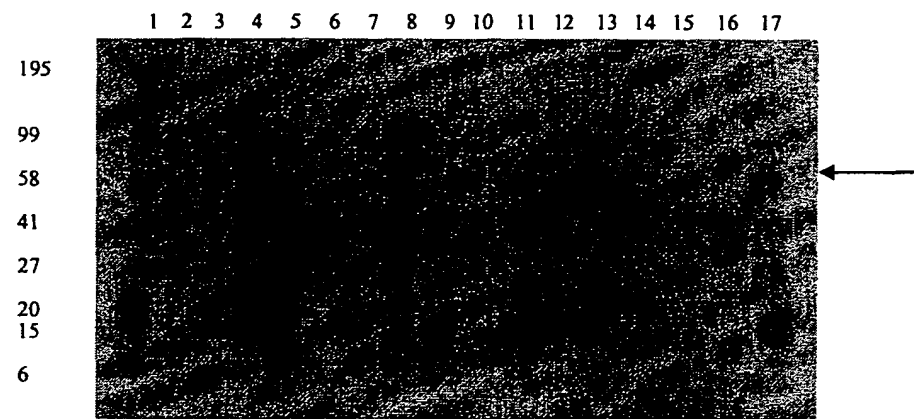


Figura 12

Sequência de proteína D 1/3 MAGE-A3-His (SEQ ID N°: 43)

N term MDP	protD 1/3	Met Asp	Mage 3	GlyGly 7xHis	C term
2	124	3		314	

MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAH 40
RGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLVV 80
IHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIOSLE 120
MTENFETMDLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT 160
EEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGASSLPT 200
TMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKV 240
AELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVI FSK 280
ASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDN 320
QIMPKAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEG 360
REDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW 400
GPRALVETSIVKVLHHMVKISGGPHISYPPLHEWVLRGE 440
EGGHHHHHHH 451
 ...

Sublinhado = sequência sinalizadora de proteína D incluindo 1-Met e as substituições 2-Asp e 3-Pro para o aa natural aa 2-Lys e 3-Thr de proteína D

Sublinhado duplo = aminoácidos 20 a 127 de proteína D

MD = aminoácidos não relacionados Met-Asp em aa 128-129 para criar um local de clonagem

GG = aminoácidos não relacionados Gly-Gly em 442-443

Pontilhado sublinhado = fragmento de MAGE3; aminoácidos 3 a 314 de MAGE3 (312 aas total).

HHHHHHH = 7 cauda de His

RESUMO

“PROTEÍNA DE FUSÃO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, VACINA, USO DE UMA PROTEÍNA OU ÁCIDO NUCLEICO OU VETORES, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, E, MÉTODO PARA TRATAR UM PACIENTE QUE SOFRE DE CÂNCER”

A presente invenção diz respeito a proteínas de fusão que compreende um antígeno derivado do denominado antígeno de rejeição de tumor PRAME (também conhecido como DAGE) ligado a um parceiro de fusão imunológico que fornece epítomos auxiliares T, tais como, por exemplo, proteína D de *Haemophilus influenzae* B, proteínas parceiras de fusão que compreendem fragmentos de proteína D, métodos para preparar os mesmos e para formular vacinas e uso dos mesmos para o tratamento de uma variedade de cânceres.