

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 228**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009** **E 09786052 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014** **EP 2440575**

54 Título: **Identificación, optimización y uso de epítomos compartidos de HLA-B*0702 para inmunoterapia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2015

73 Titular/es:

VAXON BIOTECH (100.0%)
3 rue de l'Arrivée
75749 Paris Cedex 15, FR

72 Inventor/es:

KOSMATOPOULOS, KOSTANTINOS (KOSTAS) y
MENEZ-JAMET, JEANNE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 533 228 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Identificación, optimización y uso de epítomos compartidos de HLA-B*0702 para inmunoterapia

La presente invención hace referencia al área de la inmunoterapia con péptidos. En particular, la invención proporciona nuevos métodos y materiales para tratar de manera eficaz a pacientes que tienen un fenotipo HLA-B*0702, basado en péptidos que representan epítomos compartidos de antígenos tumorales.

La inmunización o inmunoterapia con péptidos es una aproximación terapéutica que actualmente suscita un gran interés en el contexto de la prevención o tratamiento del cáncer. El principio del mismo está basado en la inmunización con péptidos que reproducen los epítomos T de los antígenos tumorales que son reconocidos por Linfocitos T citotóxicos (CTLs), los que cumplen una función en la eliminación de las células cancerígenas que expresan estos antígenos en su superficie.

Debe recordarse que los CTL no reconocen los antígenos de la proteína completa, sino fragmentos de péptidos de la misma, presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresadas en la superficie de diversas células. Estos fragmentos de péptidos constituyen los epítomos T. Los péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) tienen generalmente de 8 a 11 aminoácidos, y son reconocidos por linfocitos T CD8⁺, que representan el componente principal de la respuesta citotóxica. Durante el procesamiento del antígeno, tiene lugar una selección de péptidos, que da como resultado una jerarquía de presentación de péptidos. Los péptidos que son preferentemente presentados por las moléculas del MHC I se denominan inmunodominantes mientras que los péptidos que son presentados débilmente se denominan crípticos. Los péptidos inmunodominantes muestran una elevada afinidad por el MHC I y son inmunogénicos, mientras que los péptidos crípticos muestran una baja afinidad por MHC I y son no inmunogénicos.

La identificación de epítomos específicos a tumores, y en particular (dado el papel esencial de la respuesta del CD8⁺ en citotoxicidad) de aquellos presentados por los alelos del MHC I más frecuentes, constituye un paso esencial para el desarrollo de composiciones de inmunoterapia anti-tumoral. Muchos antígenos tumorales se conocen en la actualidad; algunos de los epítomos T de estos antígenos han sido identificados, y la eficacia de las vacunas basadas en péptidos que reproducen estos epítomos T se ha demostrado en muchos casos (Menez-Jamet y Kosmatopoulos, 2009).

Sin embargo, la expresión de la mayoría de los antígenos tumorales está restringida a ciertos tipos de tumores histológicos que limita su uso clínico. La búsqueda de antígenos tumorales "universales" expresados ampliamente ha sido intensificada con la identificación de antígenos con funciones esenciales para el mantenimiento del fenotipo oncogénico, y se está haciendo un esfuerzo para identificar epítomos expresados por una mayoría de pacientes.

Otra limitación considerable de la inmunoterapia péptido viene de la apariencia, en ciertos pacientes, de variantes tumorales (variantes de escape) que ya no expresan más el antígeno reconocido por los linfocitos T citotóxicos.

Algunos antígenos tumorales pertenecen a familias multigénicas: dentro de la misma familia, existe una homología de secuencias que pueden dar como resultado la existencia de epítomos compartidos comunes a dos o más miembros de la misma familia.

En general, diversos miembros de la misma familia de antígenos se expresan en diversos tipos de tumores; el uso de un epítomo compartido por estos antígenos podrían hacer posible obtener vacunas antitumorales con un amplio espectro de actividad.

Además, en muchos casos, diversos antígenos de la misma familia son co-expresados en la misma línea tumoral; ya que la probabilidad de pérdida de la expresión de todos estos antígenos es extremadamente baja, el uso de un epítomo compartido por estos antígenos puede evitar la aparición de variantes de escape.

Entre los antígenos tumorales que se sabe pertenecen a una familia multigénica, se hará particular mención de los antígenos de las familias MAGE-A, HER, BAGE o GAGE.

MAGE-A es una familia multigénica que consiste en 12 genes homólogos (MAGE-A1 a A12) localizados en la región q28 del cromosoma X (De Plaen et al., 1994). Entre los miembros de esta familia, MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 y -A12 son fuertemente expresados por tumores pero no por tejidos normales, con la excepción de los testículos y de la placenta.

Los antígenos MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 y -A12 están presentes en un amplio espectro de tumores de muy variado origen histológico, tales como melanomas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, tumores de cabeza y cuello, y sarcomas, mielomas, etc.

Las vacunas para el cáncer basadas en MAGE, tales como el tratamiento agente inmunoterapéutico antitumoral antígeno-específico (ASCI, por sus siglas en inglés) MAGE-A3 (GlaxoSmithKline), se encuentran actualmente en fase tardía de desarrollo con resultados alentadores. Por ejemplo, esta vacuna, que está basada en antígenos tumorales presentados al sistema inmunológico del paciente como proteínas recombinantes en combinación con un sistema adyuvante propietario de GSK, ha completado con éxito dos ensayos clínicos en melanoma y cáncer de pulmón no microcítico.

La expresión de cada antígeno MAGE-A puede variar de un tumor a otro, pero en general, la gran mayoría de tumores expresa al menos un antígeno MAGE-A.

A pesar de la ventaja potencial de utilizar epítomos T compartidos, esta aproximación sólo ha sido utilizada en contadas ocasiones debido a la poca frecuencia de regiones de tamaño apropiado (al menos 8 aminoácidos para un péptido presentado por la MHC I) que son completamente idénticas de un antígeno a otro.

Tanzarella et al. (1999) describió la identificación de un epítomo restringido por HLA-B*3701 compartido por cuatro miembros diferentes de la familia MAGE (MAGE-1, -2, -3, and -6). Los CTL específicos para un péptido que comprende este epítomo (codificado por codones 127-136 del gen MAGE-1) pudieron reconocer de forma específica las células Cos-7 cotransfectadas con HLA-B*3701 y cualquiera de estos genes MAGE.

La WO 01/42267 revela epítomos de MAGE2/3, y vacunas basadas en epítomos dirigidas a tumores que portan el MAGE2/3.

Los inventores han descrito previamente un método para la identificación de epítomos de péptidos presentados por una molécula de HLA clase I y compartidos por diversos antígenos de la misma familia multigénica. Este método está caracterizado por las siguientes etapas (EP1 485 719):

a) alinear las secuencias de dichos antígenos para identificar en cada uno de ellos una secuencia de 8 a 10 aminoácidos que comprenden al menos una secuencia pentapeptídica común precedida por 3 aminoácidos en el extremo N-terminal y, opcionalmente, seguido de uno o dos aminoácidos en el extremo C-terminal; de hecho, los autores han observado que una identidad limitada a la secuencia de 5 aminoácidos que se extiende desde las posiciones P4 a P8 del péptido era suficiente.

b) preparar los péptidos correspondientes a las secuencias identificadas y determinar la afinidad de unión de cada uno de los péptidos para la molécula de HLA de clase I implicada, y su inmunogenicidad utilizando ratones transgénicos con CMH-I humano.

c) En caso de que un péptido seleccionado sea críptico y consecuentemente no inmunogénico, el método además comprende una etapa para aumentar su inmunogenicidad.

Utilizando este método, los inventores han descrito un péptido inmunogénico definido por la secuencia YLEYRQVPV (SEQ ID No: 1), presentada por HLA-A*0201 común a los antígenos MAGE-A1, -2, -3, -4, -6, -10 y -12 de la familia MAGE-A, capaz de inducir los CTL que reconocen todos los antígenos MAGE-A, y de lisar células tumorales que expresan al menos un antígeno de la familia MAGE-A. Un estudio que describe este péptido heterocítico MAGE-A (p248V9) y sus propiedades inmunogénicas fue publicado por Graff-Dubois et al. (Journal of Immunology, 2002).

Los péptidos inmunodominantes han sido ampliamente fijados como diana por vacunas antitumorales en estudios clínicos y pre-clínicos con resultados decepcionantes (Gross et al., 2004). De hecho, los antígenos tumorales son con frecuencia autoproteínas sobre-expresadas por tumores y expresadas a niveles inferiores por células y tejidos normales. El sistema inmunológico no es capaz de reaccionar contra estos autoantígenos debido al proceso de autotolerancia. La autotolerancia afecta principalmente a los péptidos inmunodominantes, explicando de ese modo la incapacidad de estos péptidos para inducir la inmunidad tumoral.

Los péptidos crípticos están mucho menos implicados en el proceso de autotolerancia (Gross et al., 2004) y pueden por lo tanto inducir una inmunidad tumoral eficaz siempre y cuando su inmunogenicidad esté aumentada.

La estrategia habitual para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos crípticos, que debido a su baja afinidad con MHC I son no inmunogénicos, consiste en aumentar su afinidad por las moléculas de MHC I a través de sustituciones de aminoácidos. La afinidad de péptidos por las moléculas de MHC I depende principalmente de la presencia en posiciones bien definidas (posiciones de anclaje primario) de residuos llamados "residuos de anclaje primario". Estos residuos son específicos al alelo de MHC I. La presencia de residuos de anclaje primario, aunque a menudo necesario, no es suficiente para asegurar una alta afinidad de MHC I. Se ha mostrado que los residuos localizados fuera de las posiciones de anclaje primario (residuos de anclaje secundario) pueden ejercer un efecto favorable o desfavorable sobre la afinidad del péptido para el MHC I. La presencia de estos residuos de anclaje

secundario hace posible explicar la existencia, dentro de los péptidos que tienen los motivos de anclaje primario, de una gran variabilidad en la afinidad de unión (Ruppert et al., 1993).

Más aún, las sustituciones de aminoácidos que se dirigen a aumentar la afinidad por la molécula de MHC I, deben conservar la antigenicidad de tales péptidos optimizados. El CTL generado contra péptidos optimizados deben sin duda presentar reacciones cruzadas con los correspondientes péptidos nativos, que son aquellos presentados de forma natural a la superficie de la célula tumoral.

Los inventores han descrito previamente métodos para la selección de péptidos crípticos en antígenos tumorales y su optimización para inducir una respuesta inmune específica para pacientes con HLA-A*0201 ((Tourdot et al., 2000), EP 1 309 860) y HLA-B*0702 (WO 2008/010098). Un método para seleccionar epítomos crípticos restringidos por HLA-A*2402 ha sido descrito recientemente por los inventores, en una solicitud de patente que no ha sido publicada aún. Brevemente, este método consiste en seleccionar en un antígeno un péptido de 8 a 12 aminoácidos que tiene una tirosina en la posición 2, con la condición de que el péptido no tenga, simultáneamente, un aminoácido cargado positivamente (lisina o arginina) en la posición 1 y una leucina o isoleucina o una fenilalanina en la posición C-terminal. Un péptido críptico de ese tipo puede entonces ser optimizado sustituyendo su residuo N-terminal con una arginina o una lisina, y/o sustituyendo su residuo C-terminal con una leucina (o isoleucina o fenilalanina).

La HLA-B*0702 es una molécula expresada frecuentemente (25% de la población). La identificación y optimización de péptidos tumorales restringidos por HLA-B*0702, son por tanto necesarias para desarrollar vacunas eficaces contra el cáncer para pacientes que expresan HLA-B*0702.

Para identificar una vacuna anti-tumoral para pacientes que expresan HLA-B*0702, los inventores han alineado las secuencias de los antígenos MAGE-A y han buscado péptidos que tengan posiciones de anclaje 2 y 3 (respectivamente, una prolina y una arginina, o una histidina o metionina o una lisina) y una secuencia idéntica en la región que se extiende desde las posiciones P4 y P8 del péptido. No se encontró ninguna secuencia correspondiente en las regiones de MAGE-A conservadas.

Las secuencias se seleccionaron a continuación, con únicamente una modificación en la región de antigenicidad (posición P4 a P8 en 9-mers, y P4 a P9 en 10-mers), y se optimizaron epítomos no inmunogénico tal como se describe en WO 2008/010098. De manera sorprendente, los inventores han demostrado que un péptido correspondiente al epítomo críptico HLA-B*0702 modificado para aumentar su antigenicidad puede suscitar una respuesta citotóxica no sólo contra el péptido nativo, sino también contra el epítomo homólogo que está presente en otros MAGE-A antígenos.

De ahí, un primer aspecto de la presente invención es un método para identificar un péptido restringido por HLA-B*0702 que puede desencadenar una respuesta citotóxica contra al menos dos antígenos de una única familia multigénica, que comprende al menos las siguientes etapas:

(i) identificar, en los genes de dicha familia multigénica, péptidos de 9 o 10 aminoácidos que tienen una P en la posición 2 y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, K, H y M en la posición 3;

(ii) alinear las secuencias obtenidas en (i);

(iii) identificar, entre los péptidos obtenidos en la etapa (i), un grupo de al menos dos péptidos, en los que al menos un péptido es de tal manera que su región antigénica difiere de las de otros péptidos del grupo en como máximo un residuo, en donde dicha región antigénica se extiende desde la posición 4 a la posición 8 en un péptido que tiene 9 aminoácidos, y desde la posición 4 a la posición 9 en un péptido que tiene 10 aminoácidos.

Un péptido que es de tal manera que su región antigénica difiere de las de otros péptidos del grupo identificado en la etapa (iii) en como máximo un residuo, se denominará de aquí en adelante como "péptido esencialmente compartido". Un péptido de ese tipo provoca una respuesta citotóxica contra al menos dos antígenos de dicha familia multigénica.

De acuerdo con modos de realización preferidos de dicho método, el método permite la identificación de un péptido restringido por HLA-B*0702 que puede desencadenar una respuesta citotóxica contra al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete o más antígenos de dicha familia multigénica. Este es el caso cuando el grupo de péptidos seleccionado en la etapa (iii) comprende péptidos de al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete o más genes de dicha familia multigénica, respectivamente.

En un modo de realización en particular del método anterior, el grupo de péptidos seleccionados en la etapa (iii) comprende al menos dos péptidos que tienen diferentes regiones antigénicas. En este caso, ilustrados en los

ejemplos más adelante, al menos dos de estos péptidos muestran una o más diferencias en sus regiones antigénicas.

En un modo de realización preferido, el método además comprende una etapa (iv) de medición de la inmunogenicidad del péptido esencialmente compartido seleccionado. Esta etapa será preferiblemente llevada a cabo *in vivo* en un modelo apropiado, es decir, un modelo que prediga la inmunogenicidad del péptido en un individuo que expresa HLA-B*0702. Un ejemplo de un modelo apropiado de ese tipo se describe en la parte experimental y consiste en ratones transgénicos HLA-B*0702. En este modelo, la inmunogenicidad de un péptido seleccionado se mide vacunando los ratones y sometiendo a prueba si los CTL específicos han sido generados, utilizando células humanas que expresan HLA-B*0702 y cargadas con el péptido como células diana. En lo que sigue a continuación, un péptido será considerado como un epítipo no inmunogénico si ninguno de los ratones vacunados desarrolla una respuesta inmune específica contra el péptido sometido a prueba. Si algunos de los ratones, pero no todos ellos, desarrollan una respuesta inmune específica contra el péptido sometido a prueba, el péptido se considera inmunogénico, pero puede ser ventajoso mejorar adicionalmente su inmunogenicidad.

En caso de que un péptido esencialmente compartido sea no inmunogénico, o si su inmunogenicidad tiene que ser aumentada, el método además comprende una etapa para aumentar su inmunogenicidad, mediante un método según se describe en WO 2008/010098. En particular, si el péptido esencialmente compartido es no inmunogénico y tiene cualquier aminoácido excepto P en su N-terminal (especialmente si los tres residuos de dicho epítipo críptico son APR o APK o APH o APM), entonces la etapa (v) consiste en sustituir el residuo C-terminal de dicho epítipo con una leucina. En caso de que el péptido esencialmente compartido seleccionado sea no inmunogénico y tenga un aminoácido seleccionado de entre L, A, I, V, M, C o T (especialmente L, A, I, V o M) en su C-terminal, entonces la etapa (v) puede ser realizada sustituyendo el residuo N-terminal de dicho epítipo con una alanina. Por supuesto, en este método, la palabra "sustituir" ha de ser entendida como que un péptido obtiene la secuencia de la cual se deriva, de la secuencia de dicho epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 mediante la mencionada sustitución, cualquiera que sea el método técnico utilizado para obtener dicho péptido. Por ejemplo, el péptido puede ser producido por síntesis de péptidos artificiales o mediante expresión recombinante.

El método de acuerdo a la invención puede ser realizado para identificar epítopos que pueden desencadenar una respuesta inmunogénica contra diversos miembros de cualquier familia multigénica conocida, tal como las familias MAGE-A, HER, BAGE o GAGE. En un modo de realización preferido, ilustrado en la parte experimental más adelante, dicha familia multigénica es la familia MAGE-A.

Otro aspecto de la presente invención es un péptido aislado identificado por un método según se ha descrito anteriormente en donde dicho péptido seleccionado se selecciona del grupo que consiste en MPKTGFLII (SEQ ID No: 2), MPKTGLLII (SEQ ID No: 3), FPKTGLLII (SEQ ID No: 4), VPKTGLLII (SEQ ID No: 5), MPKAGLLII (SEQ ID No: 6), MPKTGILIL (SEQ ID No: 7), MPKTGFLIIV (SEQ ID No: 8), MPKTGFLIII (SEQ ID No: 9), MPKTGLLIIV (SEQ ID No: 10), FPKTGLLIIV (SEQ ID No: 11), VPKTGLLIIV (SEQ ID No: 12), MPKAGLLIIV (SEQ ID No: 13), MPKTGILILI (SEQ ID No: 14), GPRALAETS (SEQ ID No: 15), GPRALIETS (SEQ ID No: 16), GPRALVETS (SEQ ID No: 17), GPRALAETSY (SEQ ID No: 18), GPRALIETSY (SEQ ID No: 19), GPRALVETSY (SEQ ID No: 20), EPRKLLTQD (SEQ ID No: 21), HPRKLLTQD (SEQ ID No: 22), DPKKLLTQH (SEQ ID No: 23), DPKKLLTQY (SEQ ID No: 24), HPKKLLMQD (SEQ ID No: 25), EPRKLLTQDL (SEQ ID No: 26), EPRKLLTQDW (SEQ ID No: 27), HPRKLLTQDL (SEQ ID No: 28), HPKKLLMQDL (SEQ ID No: 29), DPKKLLTQHF (SEQ ID No: 30), DPKKLLTQYF (SEQ ID No: 31).

Por supuesto, en el presente texto, el término "péptido aislado" no debe ser entendido de forma restringida. Por el contrario, este término designa no solamente moléculas en las que los residuos de aminoácidos (en configuraciones L o D) están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino además pseudopéptidos o peptidomiméticos en los que el enlace peptídico está modificado, especialmente para volverse más resistente a la proteólisis, y siempre que su inmunogenicidad no resulte afectada por esta modificación.

Los péptidos optimizados inmunogénicos derivados de los epítopos de la anterior lista son también parte de la presente invención. En lo que sigue a continuación, la expresión "péptido optimizado" o "epítipo restringido por HLA-B*0702 optimizado inmunogénico" designará un péptido inmunogénico derivado de un epítipo restringido por HLA-B*0702 (denominado su "péptido nativo afín") mediante un método según se describe anteriormente y en WO 2008/010098. Los péptidos optimizados de acuerdo con la invención son péptidos de SEQ ID Nos : 32 a 67, revelados en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: péptidos nativos restringidos por HLA-B7 y péptidos optimizados correspondientes altamente homólogos entre antígenos MAGE-A (las secuencias antigénicas se destacan)

Péptidos Nativos			Secuencia antigénica	Péptido optimizado	
Nombre	Secuencia	Seq ID nº	Correspondiente a IMAGE-A	Secuencia	Seq ID nº
MAGE-A 188 (9 mers)	MPKTGFLII	2	MAGE A1, A6	APKTGFLII	32
				MPKTGFLIL	33
	MPKTGLLII	3	MAGE A2,	APKTGLLII	34
	FPKTGLLII	4	MAGE A4,	MPKTGLLIL	35
	VPKTGLLII	5	MAGE A12	FPKTGLLIL	36
				VPKTGLLIL	37
	MPKAGLLII	6	MAGE A3 MPKAGLLIL	APKAGLLII	38
				MPKAGLLIL	39
	MPKTGILIL	7	MAGE A10	APKTGILIL	40
MAGE-A 188 (10 mers)	MPKTGFLIIV	8	MAGE A1,	APKTGFLIIV	41
	MPKTGFLIII	9	MAGE A6	APKTGFLIII	42
				MPKTGFLIIL	43
	MPKTGLLIIV	10	MAGE A2,	APKTGLLIIV	44
	FPKTGLLIIV	11	MAGE A4,	MPKTGLLIIL	45
	VPKTGLLIIV	12	MAGE A12	FPKTGLLIIL	46
				VPKTGLLIIL	47
	MPKAGLLIIV	13	MAGE A3	APKAGLLIIV	48
				MPKAGLLIIL	49
	MPKTGILILI	14	MAGE A10	APKTGILILI	50
				MPKTGILILL	51
MAGE-A 267 (9 mers)	GPRALAETS	15	MAGE A1, A4	GPRALAETL	52
	GPRALIETS	16	MAGE A2, A6	GPRALIETL	53
	GPRALVETS	17	MAGE A3, A12	GPRALVETL	54
MAGE-A 267 (10 mers)	GPRALAETSY	18	MAGE A1, A4	GPRALAETSL	55
	GPRALIETSY	19	MAGE A2, A6	GPRALIETSL	56
	GPRALVETSY	20	MAGE A3, A12	GPRALVETSL	57
MAGE-A 233 (9 mers)	EPRKLLTQD	21	MAGE A1, A4, A10	EPRKLLTQL	58
	HPRKLLTQD	22	MAGE A12	HPRKLLTQL	59
	DPKKLLTQH	23	MAGE A3	DPKKLLTQL	60
	DPKKLLTQY	24	MAGE A6	DPKKLLTQL	61
	HPKKLLMQD	25	MAGE A2	HPKKLLMQL	62
MAGE-A 233 (10 mers)	EPRKLLTQDL	26	MAGE A1	EPRKLLTQDL	63
	EPRKLLTQDW	27	MAGE A4, A10	APRKLLTQDL	64
	HPRKLLTQDL	28	MAGE A12		
	HPKKLLMQDL	29	MAGE A2	APKKLLMQDL	65
	DPKKLLTQHF	30	MAGE A3	DPKKLLTQHL	66
	DPKKLLTQYF	31	MAGE A6	DPKKLLTQYL	67

La vacunación antitumoral poliespecífica ofrece un control más amplio de las células tumorales que la vacunación mono-específica, reduciendo de ese modo el riesgo de aparición de variantes de escape inmunes. En la mayoría de los casos, la inmunoterapia es entonces más eficaz cuando se dirige a diversos epítomos que cuando se dirige a un único epítomo, siempre que se sepa que el tumor expresa todos los antígenos fijados como diana. Los inventores han descrito previamente un polipéptido compuesto de péptidos crípticos optimizados restringidos por HLA-A*0201 derivados de tres diferentes antígenos tumorales universales (TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} y MAGE-A_{248V9}), llamado Vx-006 (WO 2007/073768). El Vx-006 es capaz de inducir una respuesta de células CD8 poliespecífica tanto *in vivo* en ratones HHD transgénicos HLA-A*0201 como *in vitro* en humanos, mientras que la mezcla de los péptidos TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} y MAGE-A_{248V9} no pudo inducir una respuesta tri-específica. Por lo tanto, un polipéptido quimérico que comprende diversos epítomos puede ser más eficaz que una simple mezcla de los mismos epítomos para desencadenar una respuesta contra más de un epítomo. Dependiendo del contexto, un polipéptido que comprende una repetición de un único epítomo puede también desencadenar una respuesta más fuerte contra dicho epítomo que un péptido que consiste en dicho epítomo. De hecho, una organización de polipéptidos (ya sea con diferentes epítomos o con una repetición de un único epítomo) puede producir nuevos epítomos de unión, especialmente epítomos restringidos por CD4, capaces de optimizar la respuesta inmune específica al péptido o péptidos establecidos como diana. Más aún, cuando los péptidos libres son inyectados por vía subcutánea, los péptidos se unen directamente a moléculas de MHC de cada célula presente en el sitio de inyección. Debido a que los polipéptidos necesitan ser procesados, la vacunación con polipéptidos es más eficaz para dirigir péptidos antigénicos a células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), como las células dendríticas.

Un aspecto adicional de la invención es por tanto un polipéptido quimérico, que comprende uno, dos, tres o más epítomos restringidos por HLA-B*0702 tal como se ha descrito anteriormente. En particular, un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención puede comprender uno, dos, tres o más epítomos restringidos por HLA-B*0702 nativos descritos anteriormente, o uno, dos, tres o más epítomos restringidos por HLA-B*0702 optimizados inmunogénicos seleccionados entre SEQ ID Nos: 32-67. Por supuesto, los epítomos restringidos por HLA-B*0702 optimizados pueden también combinarse, en un polipéptido quimérico, en epítomos restringidos por HLA-B*0702 nativos que han sido identificados como epítomos inmunogénicos. En un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, los epítomos pueden ser diferentes entre sí, y/o el mismo epítomo puede repetirse varias veces.

Debe de señalarse que cuando diversos epítomos específicos para la misma molécula de HLA se utilizan juntos, ya sea en una mezcla o en un polipéptido quimérico, los epítomos se encuentran en competición para la unión a la correspondiente molécula de HLA. Por el contrario, utilizando una mezcla de diferentes epítomos restringidos por HLA (HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702 u otros), o un polipéptido quimérico que comprende los mismos diferentes epítomos restringidos por HLA, no habrá competición para la unión a HLA, y se obtendrá con seguridad una respuesta poliespecífica, siempre que todas las moléculas de HLA se expresen en el individuo vacunado.

En un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, los epítomos crípticos o inmunogénicos (nativos u optimizados) restringidos por HLA-B*0702, descritos anteriormente, pueden por tanto asociarse de manera ventajosa con los péptidos descritos previamente HLA-A*0201 (WO 02/02716) y/o HLA-B*0702 (WO 2008/010010 y WO 2008/010098), y/o a péptidos HLA-A*2402 tal como se revela en la Tabla 2 más adelante, y/o a epítomos inmunogénicos derivados de antígenos asociados a tumores descritos previamente, que comprenden CEA, PRAME, Tirosinasa, TRAG-3, NY-Eso-1, P53, Muc-1, PSA/PSMA, survivina, Melan-A/MART-1, TRP-1, TRP-2, WT1, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, G250/MN/CAIX, STEAP, alfafetoproteína, RAGE-1, PAGE-1. Por supuesto, una mezcla de péptidos polialélicos, que comprende al menos un péptido de acuerdo con la presente invención y un epítomo diferente restringido por HLA (HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702 u otros), es también parte de la presente invención.

Ejemplos de epítomos que puedan combinarse de manera ventajosa en epítomos MAGE-A restringidos por HLA-B*0702 (ya sea en una mezcla o en un polipéptido quimérico), además de ejemplos de epítomos inmunogénicos optimizados que pueden ser combinados de manera ventajosa en epítomos MAGE-A restringidos por HLA-B*0702 inmunogénicos (nativos u optimizados), se describen en la Tabla 2 a continuación. Por supuesto, estas listas no son limitativas.

Tabla 2: epítomos de HLA-A2, -B7 y -A24 que pueden combinarse con epítomos de MAGE-A restringidos por HLA-B*0702 en polipéptidos quiméricos según la invención

HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido optimizado		
Antígeno	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
Mart-1 ₂₇	AAGIGILTV	68	Mart-1 _{27Y1}	YAGIGILTV	112
Mart-1 ₂₆	EAAGIGILTV	69	Mart-1 _{26LT7}	ELAGIGILTV	113

Tabla 2 (continuación)

HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido optimizado		
Antígeno	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
Gp100 ₁₇₇	AMLGTHTMEV	70	Gp100 _{177Y1}	YMLGTHTMEV	114
Gp100 ₁₇₈	MLGTHTMEV	71	Gp100 _{178Y1}	YLGTHTMEV	115
Gp100 ₁₅₄	KTWGQYWQV	72	Gp100 _{154Y1}	YTWGQYWQV	116
			Gp100 _{154M155}	KMWGQYWQV	117
Gp100 ₅₇₀	SLADTNSLAV	73	Gp100 _{570Y1}	YLADTNSLAV	118
Gp100 ₂₀₉	TDQVPFSV	74	Gp100 _{209Y1}	YDQVPFSV	119
			Gp100 _{209M210}	YMQVPFSV	120
Gp100 ₄₇₆	VLYRYGSFSV	75	GP100 _{476Y1}	YLYRYGSFSV	121
Gp100 ₄₅₇	LLDGTATLRL	76	Gp100 _{457Y1}	YLDGTATLRL	122
HER-2/neu ₇₉₉	QLMPYGCLL	77	HER-2/neu _{799Y1}	YLMPYGCLL	123
HER-2/neu ₃₆₉	KIFGSLAFL	78	HER-2/neu _{369Y1}	YIFGSLAFL	124
HER-2/neu ₇₈₉	CLTSTVQLV	79	HER-2/neu _{789Y1}	YLTSTVQLV	125
HER-2/neu ₄₈	HLYQGCQW	80	HER-2/neu _{48Y1}	YLYQGCOW	126
HER-2/neu ₇₇₃	VMAGVGSPYV	81	HER-2/neu _{773Y1}	YMAGVGSPYV	127
HER-2/neu ₅	ALCRWGLL	82	HER-2/neu _{5Y1}	YLCRWGLL	128
HER-2/neu ₈₅₁	VLVKSPNHV	83	HER-2/neu _{851Y1}	VLVKSPNHV	129
HER-2/neu ₆₆₁	ILLVVVLGV	84	HER-2/neu _{661Y1}	YLLVVVLGV	130
HER-2/neu ₆₅₀	PLTSIISAV	85	HER-2/neu _{650Y1}	YLTSIISAV	131
HER-2/neu ₄₆₆	ALIHNNTHL	86	HER-2/neu _{466Y1}	YLIHNNTHL	132
HER-2/neu ₄₀₂	TLEEITGYL	87	HER-2/neu _{402Y1}	YLEEITGYL	133
HER-2/neu ₃₉₁	PLQPEQLQV	88	HER-2/neu _{391Y1}	YLQPEQLQV	134
HER-2/neu ₉₇₁	ELVSEFSRM	89	HER-2/neu _{971Y1}	YLVSEFSRM	135
EphA2 ₆₁	DMPIYMYSV	90	EphA2 _{61Y1}	YMPIYMYSV	136
HER2 ₉₁₁	TVWELMTFGA	91 92	HER911Y1V10	YVWELMTFGV	137
HER4 ₉₁₁	TIWELMTFGG				
HER1 ₉₁₁	TVWELMTFGS	93	HER _{722Y1V9}	YVKVLGSGV	138
HER2 ₇₂₂	KVKVLGSGA	94			
HER3 ₇₂₂	KLKVLGSGV	95			
HER4 ₇₂₂	RVKVLGSGA	96			
HER1 ₇₂₂	KIKVLGSGA	97			
HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido optimizado		
Antígeno	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
HER2 ₈₄₅	DLAARNVLV	98	HER _{845Y1}	YLAARNVLV	139
HER3 ₈₄₅	NLAARNVLL	99			

Tabla 2 (continuación)

HLA-A *0201					
Péptido nativo			Péptido optimizado		
Antígeno	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
HER2 ₉₀₄	DVWSYGVTV	100	HER _{904Y1}	YVWSYGVTV	140
HER4 ₉₀₄	DVWSYGVTI	101			
HER2 ₉₃₃	DLLEKGERL	102	HER _{933Y1}	YLLEKGERL	141
HER1 ₉₃₃	SILELKGERL	103			
HER2 ₉₄₅	PICTIDVYMI	104	HER _{945Y1}	YICTIDVYMV	142
HER3 ₉₄₅	QICTIDVYMV	105			
BER4 ₉₄₅	PICTIDVYMV	106			
HER1 ₉₄₅	PICTIDVYKI	107			
MAGE-A _{248G9}	YLEYRQVPG	108	MAGE-A _{248V9}	YLEYRQVPV	143
MAGE-A _{248D9}	YLEYRQVPD	109			
TERT ₉₈₈	DLQVNSLQTV	110	TERT _{988Y1}	YLQVNSLQTV	144
TERT ₅₇₂	RLFFYRKSV	111	TERT _{572Y1}	YLFFYRKSV	145
HLA-B*0702					
Péptido nativo			Péptido optimizado		
Nombre	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
TERT ₄₄₄	DPRRLVQLL	146	TERT _{444A1}	APRRLVQLL	151
CEA _{188/554}	SPRLQLSNG	147	CEA _{188/554L9}	SPRLQLSNL	152
HER-2/neu ₁₀₆₉	APRSPLAPS	148	HER-2/neu _{1069L9}	APRSPLAPL	153
HER-2/neu ₇₆₀	SPKANKEIL	149	HER-2/neu _{760A1}	APKANKEIL	154
HER-2/neu ₂₄₆	GPKHSDCLA	150	HER-2/neu _{246A1}	APKHSDCLA	155
HLA-A*2402					
Péptido nativo			Péptido optimizado		
Nombre	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
TERT 403	PYGVLLKTH	156	TERT 403 _{KIL9}	KYGVLLKTL	165
TERT 770	PYMRQFVAH	157	TERT 770 _{RIL9}	RYMRQFVAL	166
HER 780	PYVSRLGI	158	HER 780 _{R1}	RYVSRLGI	167
EphA2 47	PYGKGWDLM	159	EphA2 47 _{RIL9}	RYGKGWDLI	168
EphA2 502	TYLVQVQAL	160	EphA2 502 _{R1}	RYLVQVQAL	169
EphA2 817	PYWELSNHE	161	EphA2 817 _{R1L9}	RYWELSNHL	170
Her2/neu 922	PYDGIPARE	162			
MAGE 261	RYEFLWGPR	163			
Her2/neu 300	PYNYLSTDV	164			

El experto en el arte puede elegir cualquier técnica conocida para producir tales polipéptidos. Por ejemplo, el polipéptido puede ser obtenido mediante síntesis química, o utilizando la tecnología de la ingeniería genética (Velders et al., 2001).

Otro objeto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico aislada diseñada para causar la expresión de un epítipo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 críptico, o de un epítipo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 inmunogénico (ya sea nativo u optimizado), o de un polipéptido quimérico tal como se ha descrito anteriormente. Por "diseñada para causar la expresión de" un péptido se entiende en la presente patente que dicho péptido es expresado como tal, aislado de todo el antígeno del que su secuencia ha sido seleccionada (y, en casos adecuados, optimizados tal como se ha descrito anteriormente), cuando el ácido nucleico se introduce en una célula apropiada. La región que codifica el epítipo o el polipéptido quimérico se situará habitualmente en el polinucleótido bajo control de un promotor adecuado. Los promotores bacterianos serán preferidos para la expresión en bacterias, que pueden producir el polipéptido ya sea *in vitro*, o, en circunstancias particulares, *in vivo*. Un ejemplo de bacteria que puede ser utilizada para producir un péptido o polipéptido de acuerdo con la invención, directamente *in vivo*, es *Listeria monocytogenes*, que es una bacteria facultativa que se introduce en las células presentadoras de antígeno mediante fagocitosis activa (Paterson y Maciag, 2005). De manera alternativa, un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser administrado directamente, utilizando un vector apropiado. En este caso, un promotor específico del tejido, constitutivo fuerte, o endógeno puede ser utilizado para controlar la expresión del péptido. Sistemas de vectores adecuados incluyen plásmidos de ADN desnudo, composiciones liposomales para mejorar la administración, y vectores virales que causan la expresión transitoria. Ejemplos de vectores virales son los adenovirus o vectores del virus vaccinia y vectores de la familia del herpes, especialmente en una forma no replicativa.

La presente invención también concierne a una composición farmacéutica que comprende al menos, como principio activo, un epítipo críptico MAGE-A restringido por HLA-B*0702 según se ha descrito anteriormente, o un epítipo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 inmunogénico (optimizado o nativo) según se ha mencionado anteriormente, o un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, o un ácido nucleico que codifica cualquiera de estos, y/o un vector que porta dicho ácido nucleico. La formulación de composiciones farmacéuticas concordará con estándares y técnicas contemporáneas. Las medicinas destinadas a su administración en humanos serán preparadas en condiciones adecuadamente estériles, en las que el ingrediente o ingredientes activos se combinan con una solución isotónica u otro soporte farmacéutico apropiado para el uso terapéutico recomendado. Formulaciones y técnicas adecuadas se describen en general en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton PA).

En particular, un epítipo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 o un polipéptido quimérico o un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser utilizado para la preparación de una composición para la inmunoterapia anticancerígena preventiva o curativa. El péptido GPRALVETL (SEQ ID No: 54), y los polipéptidos quiméricos que lo comprenden, son especialmente apropiados para este propósito.

En un modo de realización en particular, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una vacuna. En este último caso, los componentes descritos anteriormente pueden combinarse con un adyuvante para potenciar la respuesta inmune. Adyuvantes clásicos incluyen emulsiones de aceite, como adyuvante incompleto de Freund o Montanide, y superficies adherentes tales como alumbre. Adyuvantes que reclutan y activan las células dendríticas particularmente a través TLR (tales como proteínas derivadas de la membrana bacteriana o de ADN bacteriano), o ayudan a suscitar linfocitos T citotóxicos son especialmente útiles. Otros factores que de otro modo estimulan la respuesta inmune o promueven la apoptosis o la eliminación de células cancerígenas pueden también incluirse en la composición, tales como citocinas IL-2 o IL-12 o GM-CSF.

Múltiples dosis y/o diferentes combinaciones de las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden ser envasadas para su distribución por separado o juntas. Cada composición o conjunto de composiciones, tales como los kits de las piezas descritas más adelante, pueden estar acompañadas de instrucciones escritas en referencia al uso de la composición o combinación para suscitar una respuesta inmune y/o para el tratamiento contra el cáncer.

En una solicitud de patente previa (WO 2006/120038), el solicitante ha descrito un protocolo de vacunación que permite la iniciación y mantenimiento de la respuesta de un linfocito T dirigida a epítopos sub-dominantes/crípticos. Los resultados descritos en WO 2006/120038 demuestran que la inyección de un péptido nativo correspondiente a un epítipo críptico/subdominante, a continuación de la vacunación con su péptido optimizado afín, puede mantener la respuesta inmune iniciada por dicho péptido optimizado.

De acuerdo con la invención, un epítipo críptico MAGE-A restringido por HLA-B*0702 puede por tanto ser utilizado para la preparación de una composición médica para mantener la respuesta inmune del CTL iniciada por su péptido optimizado afín. Un péptido inmunogénico que tiene una secuencia de epítipo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 derivada de un epítipo críptico MAGE-A restringido por HLA-B*0702 puede además utilizarse, para la preparación de una composición médica, para iniciar una respuesta inmune del CTL contra dicho epítipo críptico MAGE-A restringido por HLA-B*0702, pero también contra todos los epítopos del grupo seleccionado en la etapa (iii) del método anteriormente descrito. Por supuesto, la mezcla de los péptidos del grupo seleccionado en la etapa (iii) puede ser utilizada para mantener la respuesta inmune de CTL iniciada por el péptido esencialmente compartido.

Por ejemplo, una mezcla de los péptidos de SEQ ID No: 15-17 puede ser utilizada para mantener la respuesta inmune del CTL iniciada por el péptido de la SEQ ID No: 54.

La presente invención además abarca un método para vacunar a un paciente contra un antígeno tumoral o vírico, en donde dicho método comprende una primera etapa de vacunación con un péptido inmunogénico optimizado afín a un epítipo críptico MAGE-A restringido por HLA-B*0702 nativo de dicho antígeno o epítipos del grupo seleccionado en la etapa (iii), seguida de una segunda etapa de vacunación con dicho péptido nativo o mezcla de péptidos del grupo considerado.

En un método de ese tipo, la primera etapa y/o la segunda etapa puede llevarse a cabo utilizando un polipéptido quimérico que comprende uno, dos, tres o más péptidos optimizados o crípticos según se describe anteriormente, en lugar de péptidos de un único epítipo. En particular, un polipéptido quimérico que comprende diversos epítipos crípticos que tienen como máximo una posición variante en su región antigénica, puede ser utilizado para mantener la respuesta inmune del CTL iniciada por el péptido optimizado afín a uno de dichos epítipos crípticos. Por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende las secuencias SEQ ID No: 15-17 puede ser utilizado para mantener la respuesta inmune del CTL iniciada por el péptido de la SEQ ID No: 54. Ha de señalarse que debido al tropismo en la expresión de los antígenos MAGE-A, si un epítipo restringido por HLA-B*0702 según se describe anteriormente demuestra ser inmunogénico, el mismo epítipo inmunogénico nativo puede ser utilizado en ambas etapas de vacunación. En particular, un epítipo MAGE-A inmunogénico nativo puede combinarse de manera ventajosa con epítipos crípticos nativos en un primer polipéptido quimérico o mezcla de péptidos mono-epítipo, y con epítipos optimizados, en un segundo polipéptido quimérico o mezcla de péptidos mono-epítipo.

La invención también concierne a un kit de piezas que comprende, en formulaciones o envases separados (viales, tubos, etc.):

(i) un primer péptido que comprende una secuencia de un epítipo (preferiblemente críptico) nativo MAGE-A restringido por HLA-B*0702, y

(ii) un segundo péptido que comprende una secuencia correspondiente a un epítipo inmunogénico optimizado afín al epítipo nativo citado en (i).

Ejemplos de péptidos que pueden ser parte de un kit de acuerdo con la invención son los péptidos de las SEQ ID Nos: 2 a 31 que pueden constituir el primer péptido, donde el segundo péptido se deriva de dicho primer péptido mediante un método para aumentar su inmunogenicidad, según se describe anteriormente y en WO 2008/010098. Un kit preferido de acuerdo a la invención comprende el péptido de SEQ ID No: 54 y, en otro envase, el péptido de SEQ ID No: 17 o 15 o 16, preferiblemente el péptido de SEQ ID No: 17. En una variante de este kit, el kit además comprende péptidos de SEQ ID Nos: 16 y/o 15, ya sea en el mismo envase que la SEQ ID No: 17, o en uno o varios envases separados.

Otros kits de piezas de acuerdo con la invención comprenden al menos un polipéptido quimérico. En este modo de realización el kit además comprende al menos un péptido afín a uno de los epítipos comprendidos en el polipéptido quimérico, en donde dicho péptido afín está aislado o incluido en otro polipéptido quimérico.

Diversas variantes preferidas de tales kits se contemplan: en un primer modo de realización, el kit comprende, en formulaciones separadas, un primer polipéptido quimérico que comprende uno, dos, tres o más epítipos crípticos MAGE-A restringidos por HLA-B*0702, y un segundo polipéptido quimérico correspondiente a su polipéptido quimérico inmunogénico MAGE-A restringido por HLA-B*0702 afín (lo que significa que comprende epítipos inmunogénicos MAGE-A restringidos por HLA-B*0702 optimizados afines a los epítipos crípticos comprendidos en el primer polipéptido quimérico). En un segundo modo de realización, el kit comprende uno, dos, tres o más péptidos correspondientes a distintos epítipos crípticos MAGE-A restringidos por HLA-B*0702 distintos, en donde dichos péptidos o bien se mezclan en una única formulación, o se separan en diversas formulaciones y, en una formulación separada, un polipéptido quimérico que comprende los epítipos inmunogénicos MAGE-A restringidos por HLA-B*0702 optimizados afines a dichos péptidos crípticos.

Tal como se menciona anteriormente, una simulación polialélica (es decir, utilizando epítipos específicos para diferentes moléculas de HLA) puede ser realizada de manera ventajosa para obtener una respuesta poliespecífica. Por consiguiente, modos de realización preferidos de los kits de acuerdo con la invención comprenden, en diferentes envases:

(i) una mezcla de péptidos polialélicos o un polipéptido quimérico polialélico, que comprende al menos un epítipo (preferiblemente críptico) nativo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 según se describe anteriormente y al menos un epítipo diferente nativo (preferiblemente críptico) restringido por HLA (de un antígeno de la familia MAGE-A o de otro antígeno), y

(ii) una mezcla de péptidos polialélicos o un polipéptido quimérico polialélico, que comprende al menos un epítipo inmunogénico MAGE-A restringido por HLA-B*0702 afín al epítipo nativo MAGE-A restringido por HLA-B*0702 citado en (i), y al menos otro epítipo inmunogénico afín al otro epítipo nativo citado en (i).

De manera alternativa, los kits de acuerdo con la invención pueden comprender, en lugar de al menos parte de los péptidos o polipéptidos quiméricos, ácido o ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos o polipéptidos quiméricos. En este caso, el ácido o ácidos nucleicos es o son tal como se describe anteriormente.

En la siguiente descripción de algunos kits específicos de acuerdo con la invención, se hará mención únicamente de los péptidos (nativos u optimizados) incluidos en la misma; se debe entender que pueden ser incluidos en los kits un polipéptido o polipéptidos quiméricos (que comprenden epítopos crípticos nativos o epítopos optimizados) en lugar de péptidos de un único epítipo, y que un ácido o ácidos nucleicos pueden también ser incluidos además de o en lugar de parte de dichos péptidos o polipéptidos quiméricos.

En un modo de realización en particular de la invención, el kit es un kit de vacunación, en donde dicho primer (nativo) y segundo (optimizado afín) péptidos están en dosis de vacunación separadas. En un modo de realización preferido, el kit de vacunación comprende 2 o 3 dosis de péptido optimizado, y 3, 4, 5 o 6 dosis de péptido nativo. Un kit de vacunación en particular de acuerdo con la invención se adapta para la primera secuencia de vacunación de 6 inyecciones, y comprende 2 o 3 dosis de péptido optimizado, y 4 o 3 dosis de péptido nativo. En caso de enfermedades de larga duración, resulta preferible mantener el nivel de inmunidad obtenido tras esta primera vacunación, mediante ciclos regulares. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante inyecciones realizadas cada 1 a 6 meses. Por lo tanto, kits complementarios, que comprenden al menos 2 dosis, y hasta 40 o 50 dosis de péptido nativo, son también parte de la presente invención. De manera alternativa, el kit de vacunación puede comprender 2 a 3 dosis de péptido optimizado, y 3 a 40 o hasta 50 dosis de péptido nativo. Por supuesto, dichos péptidos nativos y optimizados presentes en el kit son tal como se ha descrito anteriormente.

Cada dosis comprende entre 0,1 y 10 mg de péptido, preferiblemente de 1 a 5 mg, o entre 1 y 20 mg de polipéptido. En un modo de realización preferido, cada dosis está formulada para inyección subcutánea. Por ejemplo, cada dosis puede ser formulada en 0,3 a 1,5 ml de una emulsión de solución acuosa emulsionada con Montanide ISA51, utilizado como un adyuvante. El experto en el arte puede elegir cualquier otro adyuvante o adyuvantes en lugar de (o además de) Montanide ISA51. En un modo de realización en particular, las dosis son en forma de una solución acuosa. De manera alternativa, las dosis pueden ser en forma de péptido liofilizado, para la preparación extemporánea de la solución líquida a ser inyectada. Otros posibles componentes de dichos kits son uno o diversos adyuvantes, a ser añadidos a las composiciones de péptidos antes de su administración, y una nota que describe cómo utilizar dichos kits.

La invención se ilustra además por las siguientes figuras y ejemplos.

Legendas de las figuras

Figura 1: Secuencias de la familia multigénica MAGE-A. Para identificar uno o más epítopos compartidos por los diversos antígenos MAGE-A y presentados por la molécula HLA-B*0702, las secuencias de los antígenos MAGE-A se alinearon, y las regiones de al menos 5 aminoácidos se seleccionaron en base a su homología entre estos antígenos (enmarcados con una línea continua negra). Los aminoácidos que son completamente idénticos de MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12 y/o -A10 están resaltados en gris.

Figura 2: Inmunogenicidad de péptidos crípticos optimizados restringidos por HLA-B*0702. Se vacunaron ratones transgénicos HLA-B*0702 con los péptidos optimizados siguiendo el protocolo descrito y los CTL generados se sometieron a prueba contra dianas T2-B7 cargadas con los péptidos optimizados y con los nativos correspondientes según se indica. A; Vacunación con el péptido MAGE-A A1L9 de SEQ ID No: 171, B; Vacunación con el péptido monomodificado MAGE A L9 de SEQ ID No: 54.

Ejemplos

Los ejemplos han sido realizados utilizando los siguientes materiales y métodos:

Ratones transgénicos. Los ratones genéticamente deficientes o knockout HLA-B7 H-2 clase I fueron descritos previamente (Rohrlich et al., 2003).

Células. Las células T2-B7 humanas transfectadas HLA-B*0702 fueron descritas previamente (Rohrlich et al., 2003).

Péptidos y plásmidos. Los péptidos fueron sintetizados por Epytop (Nîmes, France). EL plásmido HLA-B*0702 fue proporcionado por el Dr. Lemonnier (Institut Pasteur, Paris, France) (Rohrlich et al., 2003).

Medición de la afinidad relativa del péptido con HLA-B*0702. El protocolo utilizado ha sido descrito previamente (Rohrlich et al., 2003). Brevemente, se incubaron células a 37 °C durante 16 horas con concentraciones de péptidos que se sitúan en un rango de 100 µM a 0,1 µM, y a continuación se colorearon con el anticuerpo monoclonal (mAb) ME-1 para cuantificar la expresión superficial de HLA-B*0702. Para cada concentración de péptidos, se calculó la tinción específica de HLA-B*0702 como el porcentaje de tinción obtenido con 100 µM del péptido de referencia CMV₂₆₅₋₂₇₄ (R10V; RIPHERNGFTV, SEQ ID NO: 172). Se determinó la afinidad relativa (AR) como: AR = (Concentración de cada péptido que induce un 20% de expresión de HLA-B*0702 / Concentración del péptido de referencia que induce el 20% de la expresión de HLA-B*0702).

Inducción de CTL *in vivo* en ratones transgénicos HLA-B*0702. Se inyectó a los ratones por vía subcutánea con 100 µg de péptido emulsionado en Adyuvante de Freund incompleto (IFA, por sus siglas en inglés) en presencia de 150 µg del epítipo auxiliar (TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO: 173) HBVcore₁₂₈ T restringido por I-A^b. Después de 11 días, 5x10⁷ células del bazo fueron estimuladas *in vitro* con el péptido (10 µM). En el día 6 de cultivo, el volumen de las poblaciones de respuesta se sometió a prueba para citotoxicidad específica.

Ensayo citotóxico. Las dianas se marcaron con 100 µCi de Cr⁵¹ durante 60 min, se colocaron en placas con fondo en V de 96 pocillos (3x10³ células/pocillo en 100 µL de medio RPMI 1640) y, cuando resultó necesario, se impulsaron con péptidos (1 µM) a 37 °C durante 2 horas. Los efectores se añadieron entonces a los pocillos y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se determinó el porcentaje de lisis específica como: % Lisis = (Liberación experimental – liberación espontánea) / (Liberación máxima – liberación espontánea) x 100.

Ejemplo 1: identificación de epítomos crípticos presentados por la molécula HLAB*0702 que son compartidos por los antígenos MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, A6, -A12 y/o -A10, y determinación de su afinidad con dicha molécula de HLA.

Para identificar uno o más epítomos compartidos por los diversos antígenos MAGE-A y presentados por la molécula HLAB*0702, las secuencias de los antígenos MAGE-A se alinearon (figura 1), y se buscaron las regiones de 9 a 10 aminoácidos en base a su homología entre los antígenos MAGE -A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12 y/o -A10 (secuencias resaltadas en gris, figura 1). Como la secuencia de MAGE-A10 es menos homóloga a MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A12, las secuencias compartidas no se eliminaron si no se encontraba ningún equivalente en MAGE-A10 (figura 1).

En la siguiente descripción, las regiones de 9 a 10 aminoácidos se indican en referencia a la posición de su primer aminoácido en la secuencia MAGE-A1. Únicamente dos regiones de al menos 9 aminoácidos se identificaron (posición 181 y 270). Tal como se ha descrito previamente, como existen secuencias homólogas, los autores describieron un método para identificar una secuencia de 8 a 10 aminoácidos que comprende al menos una secuencia pentapeptídica común, precedida por 3 aminoácidos en el extremo N-terminal y, opcionalmente, seguido de uno o dos aminoácidos en el extremo C-terminal; de hecho, los autores han encontrado que una identidad limitada con la secuencia de 5 aminoácidos que se extiende desde las posiciones P4 a P8 del péptido era suficiente. Las secuencias de al menos 5 aminoácidos comunes se encuentran enmarcadas en la figura 1. Utilizando este método de selección, se identificaron cuatro regiones adicionales (posición 21, 65, 132, 256).

Se identificaron a continuación péptidos de 9 o 10 aminoácidos con una P en la posición 2 y un aminoácido en el grupo que consiste en R, K, H y M en la posición 3 correspondiente a péptidos restringidos por HLA-B*0702. Tal como se muestra en la figura 1, no se encontró ninguna secuencia completamente idéntica.

Para ampliar la elección de los péptidos candidatos, se realizó una segunda búsqueda, de acuerdo con el método descrito, para seleccionar regiones que mostraban una identidad completa de secuencias entre las posiciones P4 y P8. Una vez más, no se identificó ninguna secuencia. Finalmente, una tercera búsqueda se realizó, para seleccionar secuencias que tienen solamente una falta de coincidencia entre las posiciones P4 y P8. Las secuencias identificadas están en la tabla 1 anterior, y están enmarcadas con una línea de puntos en la figura 1.

Se seleccionó el grupo MAGE-A 269 (9mers) ya que solamente tres secuencias diferentes permiten el reconocimiento de todos los genes MAGE-A (aceptando MAGE-A10). Este grupo comprende tres péptidos: MAGE-A A, SEQ ID No15 (MAGE-A1, -A4), MAGE-A I, SEQ ID No16 (MAGE-A2, -A6) y MAGE-A V, SEQ ID No17 (MAGE-A3, -A12), que difieren en términos de su posición P6. No se encontró ninguna secuencia correspondiente en MAGE-A10.

Cada péptido se sometió a prueba para su capacidad de unirse a HLA-B*0702 (tabla 3).

Tabla 3. Afinidad de los péptidos crípticos seleccionados con HLA-B*0702.

Péptido	Secuencia	AR	SEQ ID No
MAGE-A A	GPRALAETS	-	15
MAGE-A I	GPRALIETS	-	16
MAGE-A V	GPRALVETS	-	17

AR= Afinidad relativa = (concentración de cada péptido que induce el 20% de la expresión de HLA-B*0702 / Concentración del péptido de referencia que induce el 20% de la expresión de HLA-B*0702), (-) media de AR>10, (+/-) 1<AR<10, (+) 5<AR<10, (++) AR <1

Se mostró que ninguno de los tres péptidos nativos se unió a las moléculas de HLA-B*0702, a pesar del hecho de que estos péptidos albergan las posiciones de anclaje primario P2R3, lo que demuestra que son péptidos crípticos. El objetivo de este estudio era encontrar un péptido inmunogénico que sea capaz de inducir una respuesta inmune específica capaz de reconocer una célula cualquiera que sea el gen MAGE-A expresado. Más precisamente, el CTL inducido mediante la vacunación con el péptido validado, tiene que ser capaz de reconocer una célula que expresa o presenta el péptido nativo críptico MAGE-A A, MAGE-A I y MAGE-A V (reconocimiento cruzado de péptidos nativos). Los péptidos seleccionados se modificaron a continuación para aumentar su inmunogenicidad.

Ejemplo 2: aumento de la inmunogenicidad del péptido seleccionado

Para aumentar la afinidad de HLA-B*0702 y consecuentemente la inmunogenicidad de estos péptidos de baja afinidad, es necesario identificar motivos de anclaje secundarios y sustituirlos con motivos favorables. Los péptidos nativos se seleccionaron para tener las posiciones de anclaje primario P2R3; el interés se focalizó entonces en la posición de anclaje secundaria 1 y 9.

El primer péptido optimizado se sometió a prueba en base a la secuencia MAGE-AV, modificada en ambas posiciones respectivamente reemplazando la P1 por alanina (A) y la P9 por una leucina (L), conocida por ser los aminoácidos favorables para la unión de HLA-B*0702.

El péptido MAGE-A A1L9 tiene la secuencia APRALVETL (SEQ ID n°171), y fue capaz de unirse a MHC (Tabla 4), confirmando que las modificaciones han aumentado su afinidad por las moléculas HLA-B*0702. Los ratones transgénicos HLA-B*0702 se vacunaron a continuación con el péptido modificado, y once días más tarde, sus células del bazo se estimularon *in vitro* con el péptido. Tal como se muestra en la figura 2A y en la tabla 4, el péptido modificado era inmunogénico pero los CTL específicos de MAGE-A A1L9 no fueron capaces de hacer un reconocimiento cruzado de los péptidos nativos.

Las sustituciones deberían conservar, sin embargo, la conformación del segmento del péptido que interactúa con el TCR, conservando la especificidad del péptido. Ya que dos modificaciones podrían modificar la conformación del péptido, se sometió a prueba un péptido optimizado, solamente modificado en la posición 9. De hecho, una G en posición 1 se describe como neutral y no desfavorable para la afinidad del péptido con MHC.

Se mostró que MAGE-A L9 (SEQ ID No: 54) era fuertemente inmunogénico, todos los ratones vacunados desarrollaron una respuesta inmune específica contra el MAGE-A L9. Lo que es más importante, los CTL inducidos por el péptido MAGE-A L9 fueron capaces de reconocer una célula diana cargada con cada uno de los péptidos crípticos nativos (figura 2B y tabla 4).

Tabla 4: afinidad e inmunogenicidad de los péptidos optimizados.

Péptido	Secuencia	AR	Inmunogenicidad	Reconocimiento cruzado de péptidos nativos	SEQ ID No
MAGE-A A	GPRALAETS	-			15
MAGE-A I	GPRALIETS	-			16
MAGE-A V	GPRALVETS	-			17

Tabla 4 (continuación)

Péptido	Secuencia	AR	Inmunogenicidad	Reconocimiento cruzado de péptidos nativos	SEQ ID No
MAGE-A A1L9	APRALVETL	+	6/11	MAGE-A A (1/8) MAGE-A I (0/3) MAGE-A V (0/3)	171
MAGE-A L9	GPRALVETL	ND	18/18	MAGE-A A (3/8) MAGE-A I (3/5) MAGE-A V (4/5)	54

AR= Afinidad relativa = (concentración de cada péptido que induce el 20% de la expresión de HLA-B*0702 / Concentración del péptido de referencia que induce el 20% de la expresión de HLA-B*0702), (-) media de AR>10, (+/-) 1<AR<10, (+) 5<AR<10, (++) AR <1 (X/Y) significa que los ratones X desarrollaron una respuesta específica para un total de ratones vacunados Y

Referencias

- 5 De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. y et al. (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40, 360-369.
- Graff-Dubois S, Faure O, Gross DA, Alves P, Scardino A, Chouaib S, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K. (2002) Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*. 169(1):575-80.
- 10 Gross, D.A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Comet, S., Alves, P., Bennaceur-Griscelli, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., Lemonnier, F.A., Davoust, J., Miconnet, I., Vonderheide, R.H. and Kosmatopoulos, K. (2004) High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*, 113, 425-433.
- Menez-Jamet, J. y Kosmatopoulos, K. (2009) Development of optimized cryptic peptides for immunotherapy. *IDrugs*, 12, 98-102.
- 15 Paterson, Y. y Maciag, P.C. (2005) *Listeria*-based vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther*, 7, 454-460.
- Rohrlich, P.S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N. y Lemonnier, F.A. (2003) HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol*, 15, 765-772.
- 20 Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M. y Sette, A. (1993) Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74, 929-937.
- Tanzarella S, Russo V, Lionello I, Dalerba P, Rigatti D, Bordignon C, Traversari C. (1999) Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res*. 59(11):2668-74.
- 25 Tourdot, S., Scardino, A., Saloustrou, E., Gross, D.A., Pascolo, S., Cordopatis, P., Lemonnier, F.A. y Kosmatopoulos, K. (2000) A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol*, 30, 3411-3421.
- Velders, M.P., Weijzen, S., Eiben, G.L., Elmishad, A.G., Kloetzel, P.M., Higgins, T., Ciccarelli, R.B., Evans, M., Man, S., Smith, L. y Kast, W.M. (2001) Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*, 166, 5366-5373.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> IDENTIFICACIÓN, OPTIMIZACIÓN Y USO DE EPÍTOPOS COMPARTIDOS DE HLA-B*0702 PARA INMUNOTERAPIA

5 <130> VMAahF1788/5

<160> 173

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 1

15 Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln val Pro val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 2

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile
1 5

<210> 3

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 3

Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 4

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 4

Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 5

Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 6

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 6

Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 7

Met Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu
1 5

10 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 8

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

<210> 9

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 9

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

25

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 10

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

<210> 11

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 11

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

15

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 12

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

<210> 13

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 13

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

5 <210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 14

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

<210> 15

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 15

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser
1 5

20

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido

<400> 16

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ser
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 17

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser
1 5

10 <210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 18

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 19

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

25

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> péptido

<400> 20

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

<210> 21

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 21

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 22

His Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp
1 5

25 <210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 23

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His
1 5

5 <210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 24

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Tyr
1 5

<210> 25

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 25

His Pro Lys Lys Leu Leu Met Gln Asp
1 5

20

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido

<400> 26

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

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 27

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

10 <210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 28

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

<210> 29

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 29

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

25

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 30

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

<210> 31

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 31

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

15

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 32

Ala Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile
1 5

<210> 33

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 33

Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Leu
1 5

<210> 34

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

10 <400> 34

Ala Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 35

Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

20 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 36

Phe Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> péptido

<400> 37

Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

<210> 38

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 38

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 39

Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Leu
1 5

25 <210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 40

5

Ala Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu
1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido

<400> 41

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

<210> 42

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

20

<400> 42

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

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 43

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

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 44

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

10 <210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 45

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

<210> 46

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 46

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

25

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5 <400> 47

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

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 48

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

15 <210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido

<400> 49

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

<210> 50

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 50

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

<210> 51

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 51

Met Pro Lys Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu

10

1

5

10

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 52

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Leu
1 5

<210> 53

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 53

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Leu
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 54

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu
1 5

10 <210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 55

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

<210> 56

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 56

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

25

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5 <400> 57

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

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 58

Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

15 <210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido

<400> 59

His Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 60

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 60

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

<210> 61

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 61

Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln Leu
1 5

10

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 62

His Pro Lys Lys Leu Leu Met Gln Leu
1 5

<210> 63

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 63

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

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 64

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

<210> 65

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 65

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

15

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 66

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

<210> 67

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 67

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

5 <210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 68

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 69

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 69

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

20

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido

<400> 70

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

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 71

Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

10 <210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 72

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 73

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 73

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

25

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5 <400> 74

Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 75

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

15 <210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido

<400> 76

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

<210> 77

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 77

Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu
1 5

<210> 78

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

10 <400> 78

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 79

Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
1 5

20 <210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 80

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Trp
1 5

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 81

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

10 <210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 82

Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
1 5

<210> 83

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 83

val Leu val Lys Ser Pro Asn His val
1 5

25

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 84

Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val

1

5

<210> 85

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 85

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

15

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 86

Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu
1 5

<210> 87

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 87

5

Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido

<400> 88

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val
1 5

<210> 89

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

20

<400> 89

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 90

Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
1 5

<210> 91

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 91

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

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 92

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

<210> 93

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 93

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

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> péptido

<400> 94

Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

<210> 95

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 95

Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser Gly Val
1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 96

Arg Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

25 <210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> péptido

<400> 97

Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

5

<210> 98

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> péptido

<400> 98

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
1 5

<210> 99

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> péptido

20 <400> 99

Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu
1 5

$\langle 210 \rangle$ 100

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 100

Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
1 5

<210> 101

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 101

10 Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Ile
1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 102

Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210> 103

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 103

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

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 104

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

<210> 105

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 105

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

15

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 106

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

<210> 107

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 107

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

5 <210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 108

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln val Pro Gly
1 5

<210> 109

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 109

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln val Pro Asp
1 5

20

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido

<400> 110

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

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 111

Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

10 <210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 112

Tyr Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 113

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 113

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

25

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5 <400> 114

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

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 115

Tyr Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

15 <210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido

<400> 116

Tyr Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 117

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 117

Lys Met Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1

5

<210> 118

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 118

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

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 119

Tyr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 120

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 120

Tyr Met Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 121

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

10 <210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 122

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

<210> 123

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 123

Tyr Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu
1 5

25

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5 <400> 124

Tyr Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 125

Tyr Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
1 5

15 <210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido

<400> 126

Tyr Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Trp
1 5

<210> 127

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 127

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

<210> 128

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 128

Tyr Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
1 5

10

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 129

Tyr Leu val Lys Ser Pro Asn His val
1 5

<210> 130

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 130

Tyr Leu Leu val val val Leu Gly val
1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 131

Tyr Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

<210> 132

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 132

Tyr Leu Ile His His Asn Thr His Leu
1 5

15

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 133

Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
1 5

<210> 134

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 134

Tyr Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val
1 5

<210> 135

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

10 <400> 135

Tyr Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 136

Tyr Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
1 5

20 <210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 137

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

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 138

Tyr val Lys val Leu Gly ser Gly val
1 5

10 <210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 139

Tyr Leu Ala Ala Arg Asn val Leu val
1 5

<210> 140

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 140

Tyr val Trp ser Tyr Gly val Thr val
1 5

25

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 141

Tyr Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210> 142

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 142

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

15

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 143

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
1 5

<210> 144

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 144

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

<210> 145

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

10 <400> 145

Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 146

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

20 <210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido

<400> 147

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly
1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> péptido

<400> 148

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
1 5

<210> 149

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

15 <400> 149

Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 150

Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala

1

5

25 <210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 151

5

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido

<400> 152

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu
1 5

<210> 153

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

20

<400> 153

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Leu
1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 154

Ala Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5

<210> 155

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 155

Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5

10

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 156

Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His
1 5

<210> 157

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 157

Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His
1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 158

Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
1 5

<210> 159

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 159

Pro Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met
1 5

15

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 160

Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu
1 5

<210> 161

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 161

Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu
1 5

5 <210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 162

Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
1 5

<210> 163

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 163

Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg
1 5

20

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido

<400> 164

Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val
1 5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 165

Lys Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr Leu
1 5

10 <210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 166

Arg Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala Leu
1 5

<210> 167

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 167

Arg Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
1 5

25

<210> 168

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 5 <400> 168

Arg Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Leu
 1 5

<210> 169
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 <400> 169

Arg Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu
 1 5

15 <210> 170
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> péptido
 <400> 170

Arg Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Leu
 1 5

<210> 171
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> péptido

<400> 171

Ala Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu
1 5

<210> 172

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

10 <400> 172

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

<210> 173

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> epítipo

<400> 173

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

20

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un péptido restringido por HLA-B*0702 que puede desencadenar una respuesta citotóxica contra al menos dos antígenos de la familia multigénica MAGE-A, que comprende al menos las siguientes etapas:

5 (i) identificar, en los genes de dicha familia multigénica, péptidos de 9 o 10 aminoácidos que tienen una P en la posición 2 y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, K, H y M en la posición 3;

(ii) alinear las secuencias obtenidas en (i);

10 (iii) identificar, entre los péptidos obtenidos en la etapa (i), un grupo de al menos dos péptidos, en los que al menos un péptido es un "péptido esencialmente compartido", *es decir*, es de tal manera que su región antigénica difiere de las de otros péptidos del grupo en, como máximo, un residuo, en donde dicha región antigénica se extiende desde la posición 4 a la posición 8 en un péptido que tiene 9 aminoácidos, y desde la posición 4 a la posición 9 en un péptido que tiene 10 aminoácidos;

(iv) medir la inmunogenicidad del péptido esencialmente compartido; y

(v) modificar la secuencia del péptido esencialmente compartido para aumentar su inmunogenicidad;

15 en donde el péptido obtenido en la etapa (v) provoca una respuesta citotóxica contra al menos dos antígenos de dicha familia multigénica.

2. Método según la reivindicación 1, para identificar un péptido restringido por HLA-B*0702 que puede desencadenar una respuesta citotóxica contra al menos tres antígenos de dicha familia multigénica, en donde el grupo de péptidos seleccionado en la etapa (iii) comprende péptidos de al menos tres genes de dicha familia multigénica.

20 3. Método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el grupo de péptidos seleccionado en la etapa (iii) comprende al menos dos péptidos que tienen diferentes regiones antigénicas.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido esencialmente compartido seleccionado en la etapa (iii) es un epítipo no inmunogénico con cualquier aminoácido excepto P en el N-terminal, y en donde la etapa (v) consiste en sustituir el residuo C-terminal de dicho epítipo con una leucina.

25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido esencialmente compartido en la etapa (iii) es un epítipo no inmunogénico con un aminoácido C-terminal seleccionado del grupo que consiste en L, A, I, V, M, C y T, y en donde la etapa (v) consiste en sustituir el residuo N-terminal de dicho epítipo con alanina.

6. Péptido aislado identificado por un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho péptido aislado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 32 a 67.

30 7. Polipéptido quimérico, que comprende uno, dos, tres o más epítopos restringidos por HLA-B*0702 según la reivindicación 6.

8. Molécula de ácido nucleico aislado diseñada para causar la expresión de un epítipo restringido por HLA-B*0702 según la reivindicación 6 o un polipéptido quimérico según la reivindicación 10.

35 9. Composición farmacéutica que comprende al menos, como principio activo, un epítipo restringido por HLA-B*0702 según la reivindicación 6, o un polipéptido quimérico según la reivindicación 7, o un ácido nucleico según la reivindicación 8.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, que es una vacuna.

11. Un kit de piezas que comprende, en envases separados:

(i) un primer péptido que comprende una secuencia de un epítipo restringido por HLA-B*0702 seleccionado del grupo de SEQ ID Nos: 2-31, y

40 (ii) un segundo péptido que comprende una secuencia que consiste en un epítipo restringido por HLA-B*0702 optimizado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID Nos: 32-67.

12. Kit según la reivindicación 11, en donde dicho primer péptido es un epítipo aislado seleccionado en el grupo de SEQ ID Nos: 2-31, y dicho segundo péptido es su epítipo optimizado afín.

13. Kit según la reivindicación 11 o reivindicación 12, en donde dicho primer péptido comprende una secuencia seleccionada entre GPRALAETS (SEQ ID No: 15), GPRALIETS (SEQ ID No: 16) y GPRALVETS (SEQ ID No: 17), y dicho segundo péptido comprende la secuencia GPRALVETL (SEQ ID No: 54).

5 14. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que es un kit de vacunación, en donde dichos primer y segundo péptidos o polipéptidos quiméricos se presentan en dosis de vacunación separadas.

```

MAGE A2  MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQOTA-SSST-----LVEVTLGEVPAAD-SPSPPHSPQGASSFSTTINYTLMRQSDGSSNQEEGP--
MAGE A12  .....Q.....E.....R.....E.....T.....P.....S.....E.Q.....
MAGE A3  .....EA.....EA.....E.....E.....D.....Q.....P.....M.....P.....S.....Y.D.....
MAGE A6  .....T.....EA.V.....P.....PG.E.....E-AG.Q.....A.P.....SF.C.....PN.....S.....
MAGE A4  .....SS.K.....V.QE.....QV.....AT.....P.....LG.E.....T.G-TD.Q.....A.P.....F.RQ.PS.....SR.....
MAGE A1  .....S.....L.....A.....Q.....LAV.EDAS-.T..SSSFSSFPSSSSSSSSCYP.IPS.PE..S.D.ET.N..Q.A.I.C.SPSVVASLPLD.....S.K..S.ST
MAGE A10  .RAPKR.R.M..D.QSOS.TQ.E.....

-RMFDPDSEFQAAISRKNVELVHLLKYRAREPVTKAEMLESVLRNCODFFPVIFSKASEYLQLVFGIEVVEVVPISHLYLVTCGLSLDGLLGDNQVNFKTLGLLITVLAIAIEGQ
-ST.....TS..V.L...A.....F.....G.....I..F.....R.G.....LM.D.G..FA.....IV.....K.....
-ST.....L...VA.....G.VG.W.Y.....SS.....LM.D.G..FA.....I.....I.....P.....R.....
-ST.....L...VAK.....G.VG.W.Y.....DS.....LM.D.G.V..FA.....I.....F.....I.....K.....
-STS..A..L.RE.L.N.VD..A...R...K.L...R.IK.YKRC...G...S.KMI...D.K.D.A.NT.T...N.IF.....GT.M.....
-STSCI..L.R.V.TK.VAD..G.....IK.YKHC..E.G...S.....D.K.AD.TG.S.V.....I.....F.....VM.M.....P.....
LQVL..S..LPRSE.DE.VTD..Q...F..QMK..I...I...IK.YE.H..LL..E..CML.....D.K.D.TG.SFV...S...T..M.S.V.S...I..LI.S..F..W...

```

```

CAPEEKIWEELSMLEVFEGREDSVFAHPRKLLMQDLVOENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRLALETSYVKVLHHTLKIGGEPHISYPPLHERALREGE
.....V..ASD.....T.....T.....L...S.G.....W.F.....
.....V.....ILGD.K...T.H.....V.....MV..S.G.....WV.....
.....V.....I.GD.K...T.YF.....J.MV..S.G.R...L...W.....
S.S.E.....GVMG.YD...HT.YQE...T..W.....A.....VVRVNARVR.A..S.REA..LEE..GV
H...E.....VM.YD...H.AYGE...T..J.J.K...D...R.....BYVI.VSARVRFF.SLREA..REE..GV
.T...V...A.N.MGLYD.M.HLIYGE...T..W.....HA.IRKNSL.FLA.VN.SDPR.F.LWY.E..KDE..RAQDRIATTDOTTAMASASSSATGTYPE

```

Figura 1

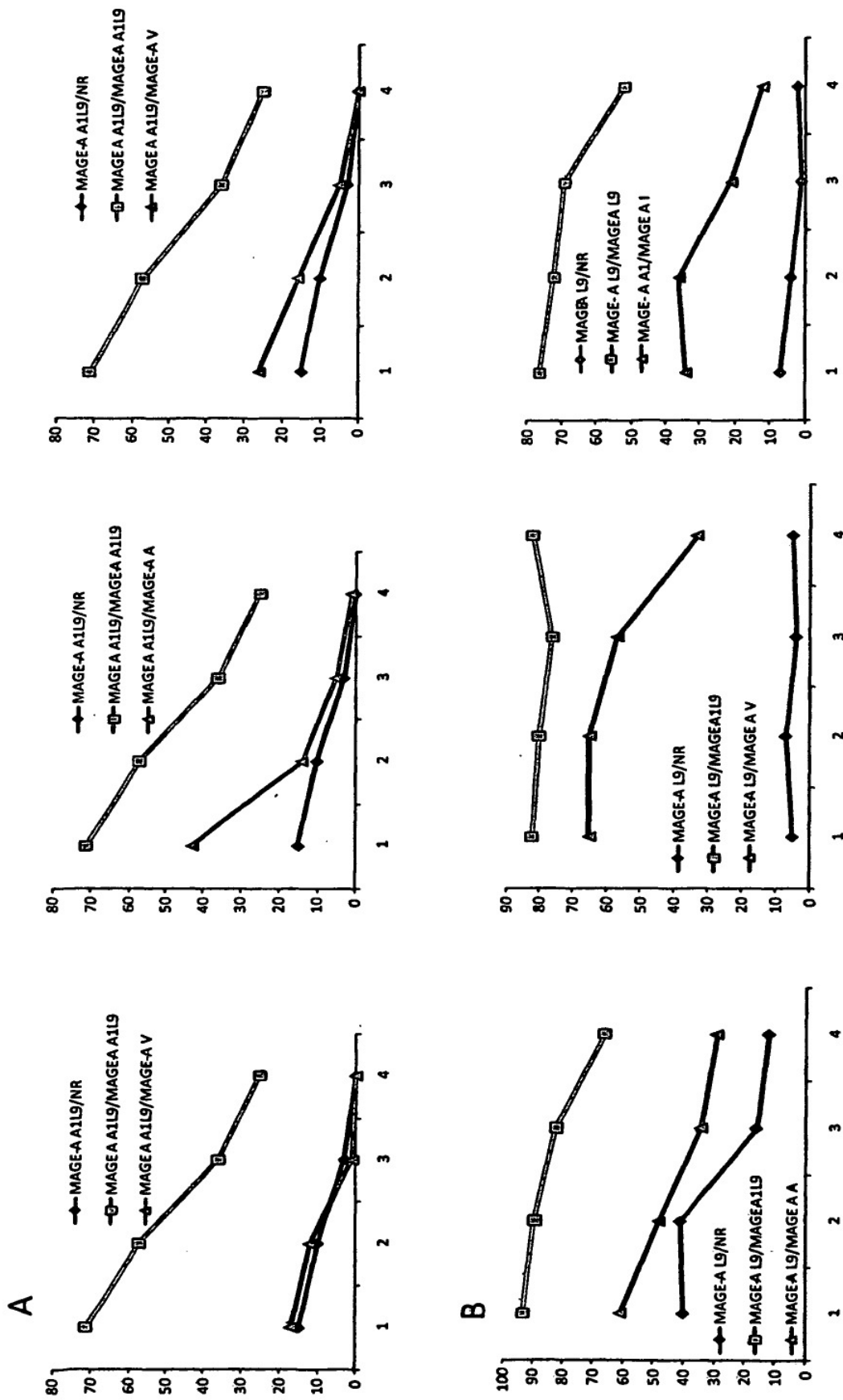


Figura 2