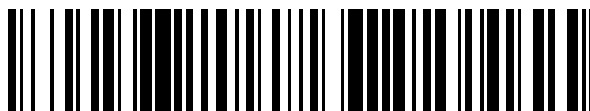


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 715**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2009 PCT/IB2009/005753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10112962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09785926 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2413956**

54 Título: **Identificación, optimización y uso de epítomos HLA-A24 crípticos para inmunoterapia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2017

73 Titular/es:

**VAXON BIOTECH (100.0%)
3 Rue de l'Arrivée, BP 191
75749 Paris Cedex 15, FR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 608 715 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 HLA-A24 crípticos para inmunoterapia

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia con péptidos. En particular, la invención proporciona nuevos procedimientos y materiales para tratar de manera efectiva a pacientes que tienen un fenotipo HLA-A*2402.

La vacunación o inmunoterapia con péptidos es una estrategia terapéutica objeto actualmente de un gran número de estudios en el contexto del tratamiento del cáncer. Su principio se basa en la inmunización con péptidos que
10 reproducen epítomos de linfocitos T de antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T citotóxicos (LTC), que desempeñan un papel importante en la eliminación de las células tumorales.

Se recordará que los LTC no reconocen antígenos proteínicos completos, sino fragmentos peptídicos de los mismos, que comprenden en general de 8 a 10 aminoácidos, presentados por moléculas del complejo mayor de
15 histocompatibilidad I (MHC I) expresado en la superficie de las células. La presentación de estos péptidos es el resultado del procesamiento de antígenos que implica tres etapas:

- degradación citosólica del antígeno por un complejo de multienzimas denominado proteasoma,
- translocación de los péptidos obtenidos de esta degradación en el retículo endoplásmico (RE) por los
20 transportadores TAP,
- asociación de estos péptidos con las moléculas MHC I y exportación de los complejos péptido/MHC I a la superficie celular.

Los complejos péptido/MHC I interactúan con el receptor de linfocitos T (RLT) específico en los LTC, induciendo la
25 estimulación y la amplificación de estos LTC, que se hacen capaces de atacar a las células diana que expresan el antígeno desde el que se obtiene el péptido.

Durante el procesamiento de antígenos, tiene lugar una selección de péptidos, que da como resultado una jerarquía de presentación de péptidos. Los péptidos que son presentados preferentemente por las moléculas de MHC I se
30 denominan inmunodominantes, mientras que los péptidos que se presentan de forma débil se conocen como crípticos. Los péptidos inmunodominantes muestran una alta afinidad por el MHC I y son inmunógenos mientras que los péptidos crípticos muestran una baja afinidad por MHC I y son no inmunógenos.

Los péptidos inmunodominantes han sido usados ampliamente como diana para vacunas tumorales en estudios
35 preclínicos y clínicos con resultados decepcionantes (Gross y col., 2004; Rosenberg y col., 2004).

Los antígenos tumorales son frecuentemente autoproteínas sobreexpresadas por tumores y expresadas en niveles inferiores por las células y los tejidos normales. El sistema inmunitario es incapaz de reaccionar contra estos autoantígenos debido al proceso de autotolerancia. La autotolerancia afecta principalmente a los péptidos
40 inmunodominantes (Cibotti y col., 1992; Gross y col., 2004), explicando así la incapacidad de estos péptidos de inducir una inmunidad tumoral.

Los péptidos crípticos intervienen mucho menos en el proceso de autotolerancia (Cibotti y col., 1992; Gross y col., 2004; Moudgil y col., 1999) y pueden inducir por tanto una inmunidad tumoral eficiente, siempre que se mejore su
45 inmunogenicidad (Engelhorn y col., 2006; Gross y col., 2004).

La estrategia habitual para mejorar la inmunogenicidad de los péptidos crípticos, que son no inmunógenos debido a su baja afinidad por MHC I, consiste en aumentar su afinidad por las moléculas de MHC I por medio de sustituciones de aminoácidos. La afinidad peptídica por las moléculas de MHC I depende principalmente de la presencia en
50 posiciones bien definidas (posiciones de anclaje primarias) de residuos denominados "residuos de anclaje primarios". Estos residuos son específicos de los alelos MHC I. La presencia de residuos de anclaje primarios, aunque a menudo necesaria, no es suficiente para asegurar una alta afinidad por MHC I. Se ha mostrado que los residuos situados fuera de las posiciones de anclaje primarias (residuos de anclaje secundarios) pueden ejercer un efecto favorable o desfavorable en la afinidad del péptido por la MHC I. La presencia de estos residuos de anclaje
55 secundarios hace posible explicar la existencia, en los péptidos que tienen los motivos de anclaje primarios, de una gran variabilidad en la afinidad de unión (Ruppert y col., 1993).

Las sustituciones de aminoácidos dirigidas a mejorar la afinidad por la molécula de MHC I deben preservar la antigenicidad de dichos péptidos optimizados. De hecho, los LTC generados por péptidos optimizados deben tener

una reacción cruzada con los péptidos naturales correspondientes.

Muchos equipos han conseguido mejorar la inmunogenicidad de péptidos ya inmunógenos aumentando su afinidad por HLA-A*0201 (Bakker y col., 1997; Parkhurst y col., 1996; Valmori y col., 1998). Los autores de la invención han descrito anteriormente una estrategia general para mejorar la afinidad y la inmunogenicidad de péptidos crípticos restringidos en HLA-A*0201 (Scardino y col., 2002; Tourdot y Gould, 2002) y HLA-B*0702 (documento WO-2008/010.098).

HLA-A*2402 es una molécula que se expresa frecuentemente (27% de la población) y es uno de los alelos más comunes en los pueblos japonés y asiáticos. La identificación y optimización de péptidos crípticos tumorales restringidos en HLA-A*2402 es necesaria por tanto para desarrollar vacunas efectivas contra el cáncer para pacientes que expresan HLA-A*2402.

Hasta la fecha se han descrito varios péptidos inmunógenos tumorales presentados por HLA-A*2402 (tabla 1).

Tabla 1: Epítomos de linfocitos T HLA-A24 inmunógenos tumorales

Antígeno	Secuencia	SEQ ID NO:
Beta-catenina	SYLDSGIHF	168
TERT	TYVPLLGS	169
TERT	CYGD MENKL	170
TERT	AVQVCGPPL	171
KM-HN-1	NYNNFYRFL	172
KM-HN-1	EYSKECLKEF	173
KM-HN-1	EYLSLSDKI	174
MAGE-A2	EYLQLVFGI	175
MAGE-A3	TFPDLESEF	176
MAGE-A3	VAELVHFL	177
MAGE-A4	NYKRCFPVI	178
SAGE	LYATVIHDI	179
CEA	QYSWFVNGTF	180
CEA	TYACFVSNL	181
gp100 / Pmel17	VYFFLPDHL	182
OA1	LYSACFWWL	183
tirosinasa	AFLPWHRLF	184
Ep-CAM	RYQLDPKFI	185
Her2/neu	TYLPTNASL	186
PRAME	LYVDSLFFL	187
PSMA	NYARTEDFF	188
RNF43	NSQPVWLCL	189
WT1	CMTWNQMNL	190

Tal como se describe en la parte experimental mostrada más adelante, los autores de la invención han encontrado ahora una estrategia para identificar, en un antígeno, péptidos crípticos presentados por la molécula HLA-A*2402, y para optimizar su inmunogenicidad, preservando la reactividad cruzada con los péptidos crípticos naturales correspondientes.

Por ello, el presente texto describe primero un procedimiento para identificar un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 en un antígeno, que comprende una etapa de selección, en dicho antígeno, de un péptido de 8 a 12 aminoácidos que tiene una tirosina (Y) en posición de anclaje primaria 2, con la salvedad de que el péptido no tiene, simultáneamente, un aminoácido de carga positiva (arginina (R) o lisina (K)) en la posición 1 y una leucina (L), o una fenilalanina (F) o una isoleucina (I) en la posición del extremo C. Dicho epítipo tiene así la secuencia $X_1YX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 20), donde X_1 a X_6 son cualquier aminoácido, X_7 a X_{10} son cualquier aminoácido o ninguno, y $X_{11} \neq L$ o F o I si $X_1 = R$ o K .

Cuando la etapa de selección anterior se realiza en solitario, las secuencias obtenidas son las de los posibles epítomos crípticos. Aunque los epítomos que responden a los criterios anteriores tienen una acusada probabilidad de ser no inmunógenos, son necesarias pruebas funcionales para identificar con certeza epítomos verdaderamente

crípticos. En particular, los autores de la invención han observado que algunos péptidos que tienen una secuencia primaria tal como se define anteriormente son en realidad inmunógenos en personas que expresan HLA-A*2402. Por ello, en la presente memoria descriptiva se describe un procedimiento para identificar un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 en un antígeno que comprende además la etapa consistente en probar la inmunogenicidad de cada posible epítipo críptico de SEQ ID NO: 20, en un modelo apropiado, y seleccionar aquellos que son no inmunógenos.

Para llevar a cabo este aspecto del procedimiento, un modelo apropiado es un modelo que predice la inmunogenicidad del péptido en una persona que expresa HLA-A*2402. Se describe un ejemplo de dicho modelo apropiado en la parte experimental y consiste en ratones transgénicos HLA-A*2402. En este modelo, la no inmunogenicidad de los posibles péptidos crípticos se verifica vacunando a los ratones y probando si han generado LTC específicos, usando células humanas que expresan HLA-A*2402 y que están cargadas con el péptido como células diana.

En lo sucesivo, las frases "epítipo críptico restringido en HLA-A*2402" o "péptido natural" se usarán para designar a cualquier péptido de SEQ ID NO: 20, se haya o no verificado su no inmunogenicidad. Cuando sea necesario, se usará la frase "posible epítipo críptico restringido en HLA-A*2402" para expresar el hecho de que la inmunogenicidad del péptido no se ha probado, y se usará la frase "epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 confirmado" para péptidos que han sido probados y en los que se ha contrastado que son no inmunógenos en un modelo apropiado.

En el presente texto, el término "péptido" designa no sólo moléculas en las que los residuos de aminoácidos (en configuraciones L o D) están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también seudopéptidos sintéticos o peptidomiméticos en los que la unión peptídica está modificada, especialmente para hacerlos más resistentes a la proteólisis, y siempre que su inmunogenicidad no se vea deteriorada por esta modificación.

De acuerdo con una realización preferida del procedimiento descrito anteriormente, el péptido seleccionado tiene de 9 a 11 aminoácidos, más preferentemente 9 ó 10 aminoácidos y uno o más aminoácidos desfavorables en las posiciones de anclaje secundarias, por ejemplo una P (prolina) en la posición 1 y/o un D o E o G o H o P o Q o R o K (ácido glutámico o aspártico, glicina, histidina, prolina, glutamina, arginina o lisina) en posición en el extremo C.

En la presente memoria descriptiva se describe también un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402; dicho procedimiento comprende una etapa de sustitución del residuo en el extremo N de dicho epítipo con un aminoácido con carga positiva (R o K), y/o de sustitución del residuo en el extremo C de dicho epítipo con una L, F o I. Preferentemente, la modificación en el extremo C es la sustitución por una L.

Naturalmente, en este procedimiento, el término "sustitución" debe entenderse como la obtención de un péptido cuya secuencia se obtiene de la secuencia de dicho epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 por la sustitución mencionada, con independencia del procedimiento técnico que se use para obtener dicho péptido. Por ejemplo, el péptido puede producirse por síntesis de péptidos artificiales o por expresión recombinante.

En particular, la inmunogenicidad de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 en la que los dos primeros residuos son RY o KY puede aumentarse sustituyendo el último aminoácido por L, F o I, preferentemente por L (o por adición de L, I o F en su extremo C, siempre que no tenga más de 11 aminoácidos). Cuando la secuencia del epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 seleccionado es $X_1YX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}L$ (SEQ ID NO: 21), donde X_1 es cualquier aminoácido pero R o K, X_2 a X_6 son cualquier aminoácido, y X_7 a X_{10} son cualquier aminoácido o ninguno, la sustitución de X_1 por R o K es suficiente para aumentar su inmunogenicidad. Más en general, cuando la secuencia del epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 seleccionado es $X_1YX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID NO: 22), donde X_1 es cualquier aminoácido pero R o K, X_2 a X_6 son cualquier aminoácido, y X_7 a X_{10} son cualquier aminoácido o ninguno, y X_{11} no es un aminoácido desfavorable (D o E o G o H o P o Q o R o K), la sustitución de X_1 por R o K puede ser suficiente para aumentar su inmunogenicidad.

En lo sucesivo, la expresión "péptido optimizado" o "epítipo restringido en A*2402 inmunógeno optimizado" designará un péptido inmunógeno obtenido de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 (denominado "péptido natural semejante") por el procedimiento anterior.

En una realización preferida del procedimiento, el péptido optimizado puede desencadenar una respuesta inmunitaria que reconoce de forma cruzada su péptido natural semejante. La presente invención se refiere así a un

procedimiento para la obtención de un epítipo restringido en HLA-A*2402 capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 de un antígeno, que comprende las etapas de:

- (i) identificación, en dicho antígeno, de uno o varios posibles epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402, por un procedimiento tal como se describe anteriormente;
- (ii) prueba de la inmunogenicidad de cada epítipo natural seleccionado en la etapa (i), en ratones transgénicos HLA-A*2402, y selección de aquellos que son no inmunógenos;
- (iii) para cada epítipo natural seleccionado en la etapa (ii), obtención de un epítipo optimizado aumentando su inmunogenicidad, por el procedimiento tal como se describe anteriormente;
- (iv) prueba de la inmunogenicidad de cada epítipo optimizado obtenido en la etapa (iii), en ratones transgénicos HLA-A*2402, y selección de los que son inmunógenos;
- (v) para cada epítipo seleccionado en la etapa (iv), prueba para determinar si los LTC generados contra el epítipo optimizado reconocen también su epítipo natural semejante, y selección de aquellos para los que la prueba es positiva.
- En la etapa (v), el reconocimiento cruzado puede ser realizado por cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, por ejemplo tal como se describe en la parte experimental.

Tal como se divulga en la parte experimental más adelante, los autores de la invención han identificado en diferentes antígenos asociados a tumores (hTERT, EphA2, MAGE o Her2/neu), una serie de posibles epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402. Al probar la inmunogenicidad de estos epítipos, se debe probar que son inmunógenos. Los autores de la invención han seleccionado los péptidos divulgados en la Tabla 2 mostrada a continuación, que son epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402 confirmados. Los péptidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y 6 forman parte de la presente invención.

Tabla 2: Péptidos restringidos en HLA-A*2402 crípticos confirmados seleccionados

Péptido	Secuencia	SEQ ID
TERT 403	PYGVLLKTH	ID N°1
TERT 770	PYMRQFVAH	ID N°2
HER 780	PYVSRLGI	ID N°3
EphA2 47	PYGKGWDLM	ID N°4
EphA2 502	TYLVQVQAL	ID N°5
EphA2 817	PYWELSNHE	ID N°6
Her2/neu 922	PYDGIPARE	ID N°7
MAGE 261	RYEFLWGPR	ID N°8
Her2/neu 300	PYNYLSTDV	ID N°9

La presente invención también se refiere a péptidos optimizados obtenidos de los péptidos crípticos de SEQ ID NO: 1 a 6, por un procedimiento de acuerdo con la invención. Los ejemplos preferidos de péptidos optimizados son KYGVLLKTL (SEQ ID NO: 11), RYMRQFVAL (SEQ ID NO: 12), RYVSRLGI (SEQ ID NO: 13), RYKGKWDLL (SEQ ID NO: 14), RYLVQVQAL (SEQ ID NO: 15), RYWELSNHL (SEQ ID NO: 16). Entre estos péptidos, las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 se han obtenido de los epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402 de SEQ ID NO: 3 y 5, respectivamente, por sustitución de sus aminoácidos en el extremo M por una R. Los péptidos de SEQ ID NO: 11, 12, 14 y 16 se han obtenido de los péptidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 6, respectivamente, sustituyendo su aminoácido en el extremo N por una R o una K y su aminoácido en el extremo C con una L.

La vacunación tumoral poliespecífica ofrece un control más extenso de las células tumorales que la vacunación monoespecífica, reduciendo así el riesgo de aparición de variantes de escape inmunitarias. En la mayoría de los casos, la inmunoterapia es más eficiente cuando se dirige a varios epítipos que cuando se dirige a un solo epítipo, siempre que se sepa que el tumor expresa todos los antígenos direccionados. Los autores de la invención han descrito anteriormente un polipéptido compuesto por péptidos crípticos optimizados restringidos en HLA-A*0201 obtenidos de tres antígenos tumorales universales diferentes (TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} y MAGE-A_{248V9}), llamados Vx-006 (documento WO-2007/073.768). Vx-006 es capaz de inducir una respuesta celular CD8 poliespecífica *in vivo* en ratones HHD transgénicos HLA-A*0201 e *in vitro* en seres humanos, mientras que la mezcla de péptidos TERT_{988Y}, HER-2/neu_{402Y} y MAGE-A_{248V9} no consiguió inducir una respuesta trispecífica. Por tanto, un polipéptido quimérico que comprende varios epítipos puede ser más eficiente que una simple mezcla de los mismos epítipos para desencadenar una respuesta contra más de un epítipo. Dependiendo del contexto, un polipéptido quimérico

que comprende una repetición de un único epítipo puede desencadenar también una respuesta más intensa contra dicho epítipo que un péptido que consiste en dicho epítipo. De hecho, una organización de polipéptidos (ya sea con varios epítopos diferentes o con una repetición de un único epítipo) puede producir nuevos epítopos de unión, especialmente epítopos restringidos en CD4, capaces de optimizar la respuesta inmunitaria específica del o de los péptidos diana. Por otra parte, cuando se inyectan péptidos libres subcutáneamente, los péptidos se unen directamente a las moléculas MHC de todas las células presentes en el sitio de inyección. Dado que los polipéptidos deben ser procesados, la vacunación con polipéptidos es más eficiente para dirigir péptidos antigénicos a células de presentación de antígenos (CPA) profesionales que las células dendríticas.

10 Un aspecto adicional de la invención es así un polipéptido quimérico, que comprende uno, dos, tres o más epítopos crípticos restringidos en HLA-A*2402 diferentes seleccionados de entre el grupo que consiste en PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1); PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2); PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4); TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6). Un aspecto adicional de la invención es un polipéptido quimérico que comprende dos, tres o más epítopos crípticos restringidos en HLA-A*2402 seleccionados de entre el grupo que consiste en
 15 PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1); PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2); PYVSRLGI (SEQ ID NO: 3); PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4); TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6).

Otro aspecto de la presente invención es un polipéptido quimérico, que comprende uno, dos, tres o más epítopos inmunógenos restringidos en HLA-A*2402 optimizados tal como se describe anteriormente. En un polipéptido
 20 quimérico que comprende epítopos inmunógenos restringidos en HLA-A*2402 optimizados de acuerdo con la invención, los epítopos pueden ser diferentes entre sí, y/o puede repetirse el mismo epítipo varias veces.

Debe observarse que cuando se usan conjuntamente varios epítopos específicos para la misma molécula HLA, ya sea en una mezcla o en un polipéptido quimérico, los epítopos están en competencia por la unión a la molécula HLA
 25 correspondiente. Por el contrario, al usar una mezcla de diferentes epítopos restringidos en HLA (HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702 u otros), o un polipéptido quimérico que comprende los mismos epítopos restringidos en HLA diferentes, no habrá competencia por la unión a HLA, y se obtendrá una respuesta poliespecífica con certeza, siempre que todas las moléculas HLA se expresen en la persona vacunada.

30 En un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, los epítopos inmunógenos crípticos u optimizados restringidos en HLA-A*2402 descritos anteriormente pueden asociarse así ventajosamente con los péptidos HLA-A*0201 (documento WO-02/02.716) y/o HLA-B*0702 (documentos WO-2008/010.010 y WO-2008/010.098) descritos anteriormente, o con epítopos inmunógenos obtenidos de los antígenos asociados a tumores descritos anteriormente, que comprenden CEA, PRAME, Tirosinasa, TRAG-3, NY-Eso-1, P53, Muc-1, PSA/PSMA, survivina,
 35 Melan-A/MART-1, TRP-1, TRP-2, WT1, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, G250/MN/CAIX, STEAP, alfa-fetoproteína, RAGE-1, PAGE-1. Naturalmente, una mezcla de péptidos polialélicos, que comprende al menos un péptido de acuerdo con la presente invención y un epítipo restringido en HLA diferente (HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702 u otros), forma parte también de la presente invención.

40 En la Tabla 3 mostrada a continuación se describen ejemplos de epítopos crípticos que pueden combinarse ventajosamente con epítopos crípticos restringidos en HLA-A*2402 (ya sea en una mezcla o en un polipéptido quimérico), así como ejemplos de epítopos inmunógenos optimizados que pueden combinarse ventajosamente con epítopos inmunógenos optimizados restringidos en HLA-A*2402. Naturalmente, estas listas no son limitativas.

45 **Tabla 3: epítopos que pueden combinarse con epítopos restringidos en HLA-A*2402 en polipéptidos quiméricos de acuerdo con la invención**

HLA-A*0201					
Péptido natural			Péptido optimizado		
Antígeno	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
Mart-1 ₂₇	AAGIGILTV	23	Mart-1 _{27Y1}	YAGIGILTV	24
Mart-1 ₂₆	EAAGIGILTV	25	Mart-1 _{26L27}	ELAGIGILTV	26
Gp100 ₁₇₇	AMLGHTHTMEV	27	Gp100 _{177Y1}	YMLGHTHTMEV	28
Gp100 ₁₇₈	MLGHTHTMEV	29	Gp100 _{178Y1}	YLGHTHTMEV	30
Gp100 ₁₅₄	KTWGQYWQV	31	Gp100 _{154Y1}	YTWGQYWQV	32
			Gp100 _{154M155}	KMWGQYWQV	33
Gp100 ₅₇₀	SLADTNSLAV	34	Gp100 _{570Y1}	YLADTNSLAV	35
Gp100 ₂₀₉	TDQVPFSV	36	Gp100 _{209Y1}	YDQVPFSV	37

			Gp100 _{209M210}	YMQVPFSV	38
Gp100 ₄₇₆	VLYRYGSFSV	39	Gp100 _{476Y1}	YLYRYGSFSV	40
Gp100 ₄₅₇	LLDGTATLRL	41	Gp100 _{457Y1}	LLDGTATLRL	42
HER-2/neu ₇₉₉	QLMPYGCLL	43	HER-2/neu _{799Y1}	YLMPYGCLL	44
HER-2/neu ₃₆₉	KIFGSLAFL	45	HER-2/neu _{369Y1}	YIFGSLAFL	46
HER-2/neu ₇₈₉	CLTSTVQLV	47	HER-2/neu _{789Y1}	YLTSTVQLV	48
HER-2/neu ₄₈	HLYQGCQW	49	HER-2/neu _{48Y1}	YLYQGCQW	50
HER-2/neu ₇₇₃	VMAGVGSPYV	51	HER-2/neu _{773Y1}	YMAGVGSPYV	52
HER-2/neu ₅	ALCRWGLL	53	HER-2/ne _{5Y1}	YLCRWGLL	54
HER-2/neu ₈₅₁	VLVKSPNHV	55	HER-2/neu _{851Y1}	YLVKSPNHV	56
HER-2/neu ₆₆₁	ILLVVVLGV	57	HER-2/neu _{661Y1}	YLLVVVLGV	58
HER-2/neu ₆₅₀	PLTSIISAV	59	HER-2/neu _{650Y1}	YLTISIISAV	60
HER-2/neu ₄₆₆	ALIHINTHL	61	HER-2/neu _{466Y1}	YLIHHNTHL	62
HER-2/neu ₄₀₂	TLEEITGYL	63	HER-2/neu _{402Y1}	YLEEITGYL	64
HER-2/neu ₃₉₁	PLQPEQLQV	65	HER-2/neu _{391Y1}	YLQPEQLQV	66
HER-2/neu ₉₇₁	ELVSEFSRM	67	HER-2/neu _{971Y1}	YLVSEFSRM	68
EphA ₂₆₁	DMPIYMYSV	69	EphA _{261Y1}	YMPIYMYSV	70
HER2 ₉₁₁	TVWELMTFGA	71	HER _{911Y1V10}	YVWELMTFGV	74
HER4 ₉₁₁	TIWELMTFGG	72			
HER1 ₉₁₁	TVWELMTFGS	73			
HER2 ₇₂₂	KVKVLGSGA	75	HER _{722Y1V9}	YVKVLGSGV	79
HER3 ₇₂₂	KLKVLGSGV	76			
HER4 ₇₂₂	RVKVLGSGA	77			
HER 1 ₇₂₂	KIKVLGSGA	78			
HER2 ₈₄₅	DLAARNVLV	80	HER _{845Y1}	YLAARNVLV	82
HER3 ₈₄₅	NLAARNVLL	81	HER _{904Y1}	YVWSYGVTV	85
HER2 ₉₀₄	DVWSYGVTV	83			
HER4 ₉₀₄	DVWSYGVTI	84	HER _{933Y1}	YLLKGERL	88
HER2 ₉₃₃	DLLEKGERL	86			
HER1 ₉₃₃	SILELKGERL	87			
HER2 ₉₄₅	PICTIDVYMI	89	HER _{945Y1}	YICTIDVYMV	93
HER3 ₉₄₅	QICTIDVYMV	90			
HER4 ₉₄₅	PJCTIDVYMV	91			
HER1 ₉₄₅	PICTIDVYKI	92			
MAGE-A _{248G9}	YLEYRQVPG	94	MAGE-A _{248G9}	YLEYRQVPV	96
MAGE-A _{248D9}	YLEYRQVPD	95			
TERT ₉₈₈	DLQVNSLQTV	97	TERT _{988Y1}	YLQVNSLQTV	98
TERT ₅₇₂	RLFFYRKSV	99	TERT _{572Y1}	YLFFYRKSV	100
HLA-B*0702					
Péptido natural			Péptido optimizado		
Nombre	Secuencia	Nº	Nombre	Secuencia	Nº
TERT ₄₄₄	DPRLVQLL	101	TERT _{444A1}	APRLVQLL	102
CEA _{188/554}	SPRLQLSNG	103	CEA _{188/554L9}	SPRLQLSNL	104
HER-2/neu ₁₀₆₉	APRSPLAPS	105	HER-2/neu _{1069L9}	APRSPLAPL	106
HER-2/neu ₇₆₀	SPKANKEIL	107	HER-2/neu _{760A1}	APKANKEIL	108
HER-2/neu ₂₄₆	GPKHSDCLA	109	HER-2/neu _{246A1}	APKHSDCLA	110

El experto en la materia puede elegir cualquier técnica conocida para producir dichos polipéptidos. Por ejemplo, el polipéptido puede obtenerse por síntesis química, o usando la tecnología de ingeniería genética (Velders y col., 2001).

5

Otro objeto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico aislada diseñada para provocar la expresión de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402, o de un epítipo inmunógeno restringido en HLA-A*2402 optimizado, o de un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención. Por "diseñada para provocar la expresión de" un péptido se entiende en la presente memoria descriptiva que dicho péptido se expresa como tal, aislado del

10 antígeno completo a partir del cual se ha seleccionado su secuencia (y, en casos apropiados, optimizado tal como se describe anteriormente), cuando el ácido nucleico se introduce en una célula apropiada. La región que codifica el

epítipo o polipéptido quimérico estará situada normalmente en el polinucleótido bajo el control de un promotor adecuado. Para la expresión en bacterias se preferirán promotores bacterianos, que pueden producir el polipéptido *in vitro*, o, en determinadas circunstancias, *in vivo*. Un ejemplo de bacteria que puede usarse para producir un péptido o polipéptido de acuerdo con la invención, directamente *in vivo*, es *Listeria monocytogenes*, que es una bacteria intracelular facultativa que entra en las células de presentación de antígeno profesionales mediante fagocitosis activa (Paterson y Maciag, 2005). Alternativamente, un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede administrarse directamente, usando un vector apropiado. En este caso, puede usarse un promotor específico de tejido, constitutivo fuerte o endógeno para controlar la expresión del péptido. Los sistemas de vectores adecuados incluyen plásmidos de ADN desnudos, composiciones liposómicas para potenciar el suministro y vectores víricos que provocan una expresión transitoria. Los ejemplos de vectores víricos son vectores de adenovirus o de virus de vacuna de la familia herpes, especialmente en forma no replicante.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos, como principio activo, un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 de acuerdo con la invención, o un polipéptido de epítipo inmunógeno optimizado tal como se menciona anteriormente, o un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, o un ácido nucleico que codifica cualquiera de ellos, y/o un vector que transporta dicho ácido nucleico. La formulación de composiciones farmacéuticas estará de acuerdo con los patrones y las técnicas del momento. Los medicamentos destinados a la administración humana se prepararán en condiciones adecuadamente estériles, en las que el o los ingredientes activos se combinan con una solución isotónica u otro vehículo farmacéutico apropiado para el uso terapéutico recomendado. Las 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 restringido en HLA-A*2402 o un polipéptido quimérico o un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede usarse para la preparación de una composición para inmunoterapia preventiva o curativa, especialmente, para inmunoterapia antivírica o anticancerosa.

En una realización 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 inmunitaria. Los adyuvantes clásicos incluyen emulsiones oleosas, como adyuvante de Freund incompleto o Montanide, y superficies adherentes tales como alúmina. Los adyuvantes que reclutan y activan células dendríticas en particular por medio de RLT (tales como ADN bacteriano o proteínas derivadas de membrana bacteriana) o ayudan a activar los linfocitos T citotóxicos son especialmente útiles. Otros factores que refuerzan por otros medios la respuesta inmunitaria o promueven la apoptosis o eliminación de células cancerosas también pueden incluirse en la composición, tales como citocinas IL-2 o IL-12 o GM-CSF.

Pueden empaquetarse múltiples dosis y/o diferentes combinaciones de las composiciones inmunógenas de la presente invención para su distribución por separado o de forma conjunta. Cada composición o conjunto de composiciones, tales como los kits de partes descritos más adelante, puede acompañarse de instrucciones por escrito en relación con el uso de la composición o combinación para desencadenar una respuesta inmunitaria y/o para el tratamiento de cáncer.

En una solicitud de patente anterior (documento WO-2006/120.038), el solicitante ha descrito un protocolo de vacunación que permite el inicio y el mantenimiento de una respuesta de los linfocitos T que se dirige a epítopos subdominantes/crípticos. Los resultados comunicados en el documento WO-2006/120.038 muestran que la inyección de un péptido natural correspondiente a un epítipo subdominante/críptico, seguido de la vacunación con su péptido optimizado semejante, puede mantener la respuesta inmunitaria iniciada por dicho péptido optimizado.

De acuerdo con la invención, un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 seleccionado de entre SEQ ID NO: 1 a 6 puede usarse así para la preparación de una composición medicinal con el fin de mantener la respuesta inmunitaria de LTC iniciada por su péptido optimizado semejante. Un péptido inmunógeno que tiene una secuencia de epítopos inmunógenos restringidos en HLA-A*2402 optimizados obtenida de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 puede usarse también para la preparación de una composición medicinal con el fin de iniciar una respuesta inmunitaria de LTC contra dicho epítipo críptico restringido en HLA-A*2402. Se describe también un procedimiento para vacunar a un paciente contra un antígeno tumoral o vírico, donde dicho procedimiento comprende una primera etapa de vacunación con un péptido inmunógeno optimizado semejante a un epítipo natural críptico restringido en HLA-A*2402 de dicho antígeno, seguido por una segunda etapa de vacunación con dicho péptido natural. En dicho procedimiento, la primera etapa y/o la segunda etapa pueden realizarse usando un polipéptido quimérico que comprende uno, dos, tres o más péptidos crípticos u optimizados tal como se describe anteriormente, en lugar de péptidos de un solo epítipo.

La invención también se refiere a un kit de partes que comprende, en formulaciones o recipientes separados (viales, tubos, etc.):

- 5 (i) un primer péptido que comprende una secuencia de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402, y
 (ii) un segundo péptido que comprende una secuencia correspondiente a un epítipo inmunógeno optimizado semejante al epítipo críptico indicado en (i).

Los ejemplos de péptidos que pueden formar parte de un kit de acuerdo con la invención son los péptidos de SEQ ID
 10 NO: 1 a 6, que pueden constituir el primer péptido, obteniéndose a continuación el segundo péptido a partir de dicho
 primer péptido por un procedimiento para aumentar su inmunogenicidad, tal como se describe anteriormente. Los
 kits preferidos de acuerdo con la invención pueden comprender así péptidos de SEQ ID NO: 1 y 11 (en recipientes
 separados), o péptidos de SEQ ID NO: 2 y 12 (en recipientes separados), o péptidos de SEQ ID NO: 3 y 13 (en
 recipientes separados), o péptidos de SEQ ID NO: 4 y 14 (en recipientes separados), o péptidos de SEQ ID NO: 5 y
 15 15 (en recipientes separados), o péptidos de SEQ ID NO: 6 y 16 (en recipientes separados).

Otros kits de partes de acuerdo con la invención comprenden al menos un polipéptido quimérico. En esta realización,
 el kit también comprende al menos un péptido semejante a uno de los epítipos comprendido en el polipéptido
 quimérico, donde dicho péptido semejante está aislado o incluido en otro polipéptido quimérico.

20 Se contemplan varias variantes preferidas de dichos kits: En una primera realización, el kit comprende, en
 formulaciones separadas, un primer polipéptido quimérico que comprende uno, dos, tres o más epítipos crípticos
 restringidos en HLA-A*2402, y un segundo polipéptido quimérico correspondiente a su polipéptido quimérico
 inmunógeno restringido en HLA-A*2402 semejante (lo que significa que comprende epítipos inmunógenos
 25 restringidos en HLA-A*2402 optimizados semejantes a los epítipos crípticos comprendidos en el primer polipéptido
 quimérico). En una segunda realización, el kit comprende uno, dos, tres o más péptidos correspondientes a distintos
 epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402, donde dichos péptidos están mezclados en una única formulación, o
 separados en varias formulaciones y, en una formulación separada, un polipéptido quimérico que comprende los
 epítipos inmunógenos restringidos en HLA-A*2402 optimizados semejantes a dichos péptidos crípticos.

30 Tal como se menciona anteriormente, puede realizarse ventajosamente una estimulación polialélica (es decir, que
 usa epítipos específicos para diferentes moléculas HLA) para obtener una respuesta poliespecífica. En
 consecuencia, las realizaciones preferidas de los kits de acuerdo con la invención comprenden, en recipientes
 separados:

- 35 (i) una mezcla de péptidos polialélicos o un polipéptido quimérico polialélico, que comprende al menos un epítipo
 críptico restringido en HLA-A*2402 tal como se describe anteriormente y al menos un epítipo críptico restringido en
 HLA diferente, y
 (ii) una mezcla de péptidos polialélicos o un polipéptido quimérico polialélico, que comprenden al menos un epítipo
 40 inmunógeno restringido en HLA-A*2402 semejante al epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 indicado en (i), y al
 menos otro epítipo inmunógeno semejante al otro epítipo críptico indicado en (i).

Alternativamente, 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.

45 En este caso, el o los ácidos nucleicos son tal como se describe anteriormente.

En la siguiente descripción de algunos kits específicos de acuerdo con la invención, se hará mención sólo de los
 péptidos (naturales u optimizados) incluidos en el mismo; debe entenderse que el o los polipéptidos quiméricos (que
 comprenden epítipos crípticos naturales o epítipos optimizados) pueden estar incluidos en los kits en lugar de
 50 péptidos de un único epítipo, y que el o los ácidos nucleicos también pueden incluirse además o en lugar de al
 menos parte de dichos péptidos o polipéptidos quiméricos.

En una realización particular de la invención, el kit es un kit de vacunación, donde dichos péptidos primero (natural) y
 segundo (optimizado semejante) están en dosis de vacunación separadas. En una realización preferida, el kit de
 55 vacunación comprende 2 ó 3 dosis de péptido optimizado, y 3, 4, 5 ó 6 dosis de péptido natural. 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 ó 3 dosis de péptido optimizado, y 4 ó 3 dosis de péptido natural. En caso de
 enfermedades de larga duración, es preferible mantener el nivel de inmunidad obtenido después de esta
 primovacunación, con refuerzos regulares. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante inyecciones aplicadas cada

1 a 6 meses. Por tanto, los kits complementarios, que comprenden al menos 2 dosis, y hasta 40 ó 50 dosis de péptido natural, también forman parte de la presente invención. Alternativamente, el kit de vacunación puede comprender de 2 a 3 dosis de péptido optimizado, y de 3 a 40 o hasta 50 dosis de péptido natural. Naturalmente, dichos péptidos naturales y optimizados presentes en el kit son tal como se describe anteriormente.

5

Cada dosis comprende entre 0,1 y 10 mg de péptido, preferentemente de 1 a 5 mg, o entre 1 y 20 mg de polipéptido. En una realización preferida, cada dosis se formula para inyección subcutánea. Por ejemplo, cada dosis puede formularse en de 0,3 a 1.5 ml de una emulsión de solución acuosa emulsionada con Montanide ISA51, usado como adyuvante. El experto en la materia puede elegir cualquier otro adyuvante en lugar de (o además de) Montanide

10

ISA51. En una realización particular, las dosis están en forma de una solución acuosa. Alternativamente, las dosis pueden estar en forma de un péptido liofilizado, para preparación extemporánea de la solución líquida que se inyectará. Otros posibles componentes de dichos kits son uno o varios adyuvantes, que se añadirán a las composiciones peptídicas antes de la administración, y una advertencia que describe cómo usar dichos kits.

15

La invención se ilustra adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes.

LEYENDAS DE FIGURAS

Figura 1 : Inmunogenicidad de péptidos crípticos HLA-A*2402. Se vacunó a ratones transgénicos HLA-A*2402 con los péptidos crípticos según el protocolo descrito y los LTC generados se probaron frente a dianas T2-A24 cargadas con péptido tal como se indica (NR, péptido no relevante). El porcentaje de lisis específica se determinó como: $Lisis = (liberación\ experimental - liberación\ espontánea) / (liberación\ máxima - liberación\ espontánea) \times 100$. Se probaron cuatro diluciones de LTC, correspondientes a cuatro proporciones de LTC/células diana.

20

Figura 2: Inmunogenicidad de péptidos crípticos optimizados restringidos en HLA-A*2402. Se vacunó a los ratones transgénicos HLA-A*2402 con el péptido optimizado según el protocolo descrito y los LTC generados se probaron frente a dianas T2-A24 cargadas con péptido optimizado (inmunogenicidad), péptido natural correspondiente (reconocimiento cruzado de péptidos naturales) o un péptido irrelevante (NR) tal como se indica. El porcentaje de lisis específica se determinó como: $Lisis = (liberación\ experimental - liberación\ espontánea) / (liberación\ máxima - liberación\ espontánea) \times 100$. Se probaron cuatro diluciones de LTC, correspondientes a cuatro proporciones de LTC/células diana.

25

30

EJEMPLOS

Los ejemplos se han realizado usando los siguientes materiales y procedimientos:

35

Ratones transgénicos. Los ratones transgénicos usados en los experimentos descritos se obtuvieron cruzando ratones transgénicos HLA-A24 descritos previamente (Barra y col., 1993) y ratones H2 Kb^{H2Db} inactivados transgénicos para microglobulina $\beta 2$ humana y cadena CD8 α (Perarnau y col., 1999).

40

Péptidos. Los péptidos fueron sintetizados por Epytop (Nimes, Francia).

Células. Las células T2-A24 negativas TAP humanas transfectadas HLA-A*2402 fueron descritas previamente (Miyahara y col., 2005), y las proporcionó el Dr. Lemonnier (Institut Pasteur, París, Francia). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo RPMI1640 suplementado con FCS al 10%.

45

Medida de afinidad relativa del péptido a HLA-A*2402. El protocolo usado ha sido descrito previamente (Rohrlich y col., 2003). De forma sucinta, se incubaron células T2-A24 a 37°C durante 16 horas con concentraciones de péptidos comprendidas entre 100 μ M y 0,1 μ M, y después se tñeron con anticuerpo monoclonal (AMc) 0041 HA (One Lambda, Inc.) para cuantificar la expresión de superficie de HLA-A*2402. Para cada concentración de péptido, la tinción específica de HLA-A*2402 se calculó como el porcentaje de tinción obtenido con 100 μ M del patrón de péptido de referencia A24 (AYIDNYNKF, SEQ ID NO: 111). La afinidad relativa (AR) se determinó como: $AR = (Concentración\ de\ cada\ péptido\ que\ induce\ el\ 30\% \ de\ expresión\ de\ HLA-A*2402 / concentración\ del\ péptido\ de\ referencia\ que\ induce\ el\ 30\% \ de\ expresión\ de\ HLA-A*2402)$.

50

55

Inducción de LTC in vivo en ratones transgénicos HLA-A*2402. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 100 μ g de péptido emulsionado en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) en presencia de 150 μ g del epítipo de linfocitos T cooperadores HBVcore₁₂₈ restringidos en I-A^b (TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO: 112). Al cabo de 15 días, 5 x 10⁷ células del bazo se estimularon dos veces *in vitro* con péptido (10 μ M), en intervalos de 6 días.

En el día 13 de cultivo, las poblaciones que respondieron en masa se sometieron a prueba para valorar la citotoxicidad específica frente a células diana que expresan HLA-A*2402 y se cargaron con el mismo péptido.

Ensayo de reconocimiento cruzado. Se inyectaron a los ratones por vía subcutánea 100 µg de péptido optimizado emulsionado en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) en presencia de 150 µg del epítipo de linfocitos T cooperadores HBVcore₁₂₈ restringidos en I-A^b (TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO: 112). Al cabo de 15 días, se estimularon 5 x 10⁷ células del bazo primero *in vitro* con el péptido optimizado (10 µM), y después en el día 6 de cultivo con el péptido natural correspondiente. En el día 13, las poblaciones que respondieron en masa se sometieron a prueba para valorar la citotoxicidad específica frente a células diana que expresan HLA-A*2402 y se cargaron con el péptido optimizado, el natural o uno irrelevante.

Ensayo citotóxico. Las dianas se marcaron con 100 µCi de Cr⁵¹ durante 60 min, se sembraron en placas con fondo en V de 96 pocillos (3 x 10³ células/pocillo en 100 µL de medio RPMI 1640) y, cuando fue necesario, se pulsaron con péptidos optimizados o naturales (1 µM) a 37°C durante 2 horas. A continuación se añadieron cuatro diluciones de células efectoras en los pocillos y se incubaron a 37°C durante 4 horas. El porcentaje de lisis específica se determinó como: Lisis = (liberación experimental – liberación espontánea) / (liberación máxima – liberación espontánea) x 100.

Ejemplo 1: Afinidad e inmunogenicidad de péptidos crípticos seleccionados

Los autores de la invención han seleccionado 10 péptidos naturales de acuerdo con el procedimiento de selección descrito anteriormente. En primer lugar se probó en siete péptidos la capacidad de unirse a moléculas HLA-A*2402. Todos los péptidos menos dos tuvieron una capacidad baja o no pudieron unirse a HLA-A*2402.

Tabla 4: HLA-A*2402 afinidad de péptidos crípticos. AR = Afinidad relativa = (Concentración de cada péptido que induce el 30% de expresión HLA-A*2402 / Concentración del péptido de referencia que induce el 30% de expresión HLA-A*2402), (-) significa AR >100, (+/-) 10<AR<100, (+) 5<AR<10, (++) AR <5, ND: no determinado

Antígeno/posición	Secuencia	AR	SEQ ID NO:
TERT403	PYGVLKTH	-	1
TERT 770	PYMRQFVAH	+/-	2
Her2/neu 780	PYVSRLGI	++	3
EphA2 47	PYGKGDLM	ND	4
EphA2 502	TYLVQVQAL	ND	5
EphA2 817	PYWELSNHE	ND	6
Her2/neu 922	PYDGIPARE	-	7
MAGE 261	RYEFLWGPR	-	8
Her2/neu 300	PYNYLSTDV	-	9
Her2/neu 802	PYGCLLDHV	+	10

A continuación se vacunó a los ratones transgénicos HLA-A24 con los péptidos seleccionados, y quince días más tarde, se estimularon *in vitro* sus células del bazo dos veces en intervalos de 6 días con el péptido. Se detectaron LTC específicos de péptidos en los ratones vacunados con péptidos de alta afinidad de control seleccionados como poseedores de motivos de anclaje en Y2 primarios y/o en el extremo C (datos no mostrados). Se mostró también que los péptidos naturales, que no fueron capaces de unirse a HLA-A*2402 eran no inmunógenos (figura 1) y se demostró que Her2/neu 802, que se une a HLA-A*2402, era inmunógeno en los ratones transgénicos. Esto confirma que existe una correlación entre la afinidad de unión y la inmunogenicidad para los péptidos restringidos en HLA-A*2402.

No obstante, dado que Her2/neu 780 se une con fuerza a HLA-A*2402 pero finalmente no es inmunógeno, los autores de la invención decidieron seleccionar los péptidos naturales sólo según su incapacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica en ratones transgénicos HLA-A24. Finalmente, sólo un péptido natural seleccionado de acuerdo con el procedimiento de selección descrito fue capaz de generar una respuesta inmunitaria específica en ratones transgénicos HLA-A*2402, lo que confirma que el procedimiento descrito permite seleccionar de manera eficiente posibles péptidos crípticos. La inmunogenicidad de péptidos naturales seleccionados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: HLA-A*2402 inmunogenicidad de péptidos crípticos seleccionados. (-) significa que ninguno de los

ratones vacunados con el péptido natural correspondiente desarrolla una respuesta inmunitaria específica, (+) que menos del 50% de los ratones vacunados respondieron, (++) que más del 50% respondieron. ND: no determinado

Antígeno/posición	Secuencia	Inmunogenicidad	SEQ ID NO
TERT403	PYGVLLKTH	-	1
TEXT770	PYMRQFVAH	-	2
Her2/neu 780	PYVSRLGI	-	3
EphA2 47	PYGKGWDLM	-	4
EphA2 502	TYLVQVQAL	-	5
EphA2 817	PYWELSNHE	-	6
Her2/neu 922	PYDGIPARE	ND	7
MAGE 261	RYEFLWGPR	-	8
Her2/neu 300	PYNYLSTDV	-	9
Her2/neu 802	PYGCLLDHV	++	10

5 Ejemplo 2: Mejora de la inmunogenicidad de los péptidos crípticos seleccionados

Para potenciar la afinidad de HLA-A*2402 y en consecuencia la inmunogenicidad de péptidos de baja afinidad con los motivos de anclaje específicos de HLA, fue necesario identificar motivos de anclaje secundarios desfavorables y sustituirlos por motivos favorables. Sin embargo, estas sustituciones deben preservar la conformación del segmento peptídico que interacciona con el RLT (posición 4 a posición 8). El interés se centró, por tanto, en la posición de anclaje secundaria 1. Los aminoácidos con carga positiva (lisina (K) o arginina (R)) son motivos favorables en la posición 1 mientras que una prolina (P) es un aminoácido desfavorable.

Por otra parte, tal como se ilustra en la tabla 6 mostrada a continuación, más del 50% del epítipo CD8 HLA-A*2402 identificado en los tumores y en las células de VIH, tiene una leucina (L) en la posición del extremo C. Los autores de la invención decidieron así usar L como la modificación en el extremo C con el fin de potenciar la inmunogenicidad de péptidos que tienen preferentemente aminoácidos desfavorables en esta posición (ácido aspártico o glutámico (D, E), glicina (G), histidina (H), glutamina (Q), lisina (K), prolina (P) o arginina (R)).

20 Tabla 6: Epítomos restringidos en HLA-A*2402 derivados de tumores y VIH

Antígeno	Secuencia	Nº	referencia
Betacatenina	SYLDSGIHF	113	http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/mutation.htm http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/tumorspecific.htm http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/differentiation.htm http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/overexpressed.htm
KM-HN-1	NYNNFYRFL	114	
KM-HN-1	EYSKECLKEF	115	
KM-HN-1	EYLSLSDKI	116	
MAGE-A2	EYLQLVFGI	117	
MAGE-A3	TFPDLESEF	118	
MAGE-A3	VAELVHFL	119	
MAGE-A4	NYKRCFPVI	120	
SAGE	LYATVIHDI	121	
CEA	QYSWFVNGTF	122	
CEA	TYACFVSNL	123	
gp100/Pme17	VYFFLPDHL	124	
OA1	LYSACFWWL	125	
tirosinasa	AFLPWHLRF	126	
Ep-CAM	RYQLDPKFI	127	
Her2/neu	TYLPTNASL	128	
PRAME	LYVDSLFFL	129	
PSMA	NYARTEDFF	130	
RNF43	NSQPWWLCL	131	
TERT	TYVPLLGSL	132	Péptidos ref TERT
TERT	CYGD MENKL	133	
TERT	AVQVCGPPL	134	

WT1	CMTWNQMNL	135	http://hiv-web.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl.summary.html
p17	HYMLKHLVW	136	
p17	KYKCLKHIVW	137	
p17	LYNTVATL	138	
p17	LYGVHQKI	139	
p17-p24	NYPIVQNL	140	
p24	EIYKRWIIL	141	
p24	IYKRWIIL	142	
p24	IYKRWIILGL	143	
p2p7p1p6	LYPLASLRSL	144	
RT	DAYFSVPL	145	
RT	VYYDPSKDL	146	
RT	IYQEPFKNL	147	
Integrasa	GYIEAEVI	148	
gp160	LFCASDAKAY	149	
gp160	RYLRDQQL	150	
gp160	RYLKDQQLL	151	
gp160	RYLRDQQLL	152	
gp160	RYLRDQQLLGI	153	
gp160	YLKDQQLL	154	
gp160	YLRDQQLL	155	
gp160	WYIKIFIMI	156	
gp160	SYRRLRDLL	157	
Nef	TYKAAVDL	158	
Nef	HSQRRQDIL	159	
Nef	RQDILDLWI	160	
Nef	GYFPDWQNY	161	
Nef	NYTPGPGVRY	162	
Nef	RYPLTFGW	163	
Nef	RYPLTFGWCF	164	
Nef	RYPLTFGWCY	165	
Nef	DSRLAFHHM	166	
Nef	AFHHVAREL	167	

Los péptidos optimizados se sometieron a ensayo en términos de su inmunogenicidad (tabla 7, figura 2), para mostrar que la modificación elegida mejora la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica en ratones transgénicos HLA-A24 para seis péptidos naturales. Los ratones transgénicos HLA-A24 vacunados con los péptidos 5 TERT 403KIL9, TERT 770R1L9, HER 780R1, EphA2 47R1L9, EphA2 502R1 y EphA2 817R1L9 desarrollaron LTC específicos de péptidos.

Es importante señalar que los LTC generados en ratones vacunados con péptidos optimizados reconocieron las células diana cargadas con el péptido natural correspondiente (figura 2).

10

Antígeno/posición	Modificación	Secuencia	Inmunogenicidad	Reconocimiento cruzado de péptidos naturales	SEQ ID NO
TERT 403		PYGVLLKTH	-(0/3)		1
TERT 403	K1L9	KYGVLLKTL	+(4/15)	+(3/15)	11
TERT 770		PYMRQFVAH	-(0/3)		2
TERT 770	R1L9	RYMRQFVAL	++(12/18)	+(5/18)	12
HER 780		PYVSRLG	-(0/8)		3
HER 780	R1	RYVSRLG	+(4/9)	+(3/9)	13
EphA2 47		PYGKQWDLM	-(0/6)		4
EphA2 47	R1L9	RYGKQWDL	++(7/9)	++(7/9)	14
EphA2 502		TYLVQVQAL	-(0/3)		5
EphA2 502	R1	RYLVQVQAL	++(3/3)	++(2/3)	15
EphA2 817		PYWELSNHE	-(0/3)		6

EphA2 817	R1L9	RYWELSNHL	++(2/3)	++(2/3)	16
Her2/neu 922		PYDGIPARE	ND		7
Her2/neu 922	R1L9	RYDGIPARL	-(0/9)		17
MAGE 261		RYEFLWGPR	-(0/3)		8
MAGE 261	L9	RYEFLWGPL	-(0/9)		18
Her2/neu 300		PYNYLSTDV	-(0/3)		9
Her2/neu 300	R1L9	RYNYLSTDV	-(0/9)		19

Tabla 7: Inmunogenicidad de péptidos naturales y modificados y reconocimiento cruzado de péptidos naturales. (-) significa que ninguno de los ratones vacunados con los péptidos naturales correspondientes desarrolla una respuesta inmunitaria específica, (+) que menos del 50% de los ratones vacunados respondieron, (++) que más del 50% respondieron. (X/Y) significa que los ratones X desarrollan una respuesta específica entre un total de ratones Y vacunados. ND: no determinado.

En conclusión, los autores de la invención describen un procedimiento para optimizar la inmunogenicidad de péptidos crípticos restringidos en HLA-A*2402. Consiste en a) selección de péptidos crípticos con Y2 y aminoácidos desfavorables en la posición de anclaje secundaria 1 y/o 9; y b) sustitución de los aminoácidos desfavorables en la posición en el extremo N con un aminoácido de carga positiva (R o K) y el residuo en el extremo C con una L cuando es necesaria esta última sustitución.

Usando estos procedimientos de selección/optimización, los autores de la invención describieron también 6 péptidos crípticos optimizados que inducen LTC específicos en ratones transgénicos capaces de reconocer células que presentan el péptido natural correspondiente.

REFERENCIAS

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

Barra, C., Goumier, H., Garcia, Z., Marche, P.N., Jouvin-Marche, E., Briand, P., Fillipi, P. and Lemonnier, F.A. (1993) Abrogation of H-2-restricted CTL responses and efficient recognition of HLA-A3 molecules in DBA/2 HLA/A24 responder mice. *J Immunol*, 150, 3681-3689.

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

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

30 Gross, D.A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Cornet, 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.

Miyahara, Y., Naota, H., Wang, L., Hiasa, A., Goto, M., Watanabe, M., Kitano, S., Okumura, S., Takemitsu, T., Yuta, A., Majima, Y., Lemonnier, F.A., Boon, T. and Shiku, H. (2005) Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL, epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res*, 11, 5581-5589.

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

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

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

45 Perarnau, B., Saron, M.F., San Martin, B.R., Bervas, N., Ong, H., Soloski, M.J., Smith, A.G., Ure, J.M., Gairin, J.E. and Lemonnier, F.A. (1999) Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8+ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *Eur J Immunol*, 29, 1243-1252.

Rohrlich, P.S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N. and 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.

50 Rosenberg, S.A., Yang, J.C. and Restifo, N.P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 10, 909-915.

Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M. and Sette, A. (1993) Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. Cell, 74, 929-937.

Scardino, A., Gross, D.A., Alves, P., Schultze, J.L., Graff-Dubois, S., Faure, O., Tourdot, S., Chouaib, S., Nadler, L.M., Lemonnier, F.A., Vonderheide, R.H., Cardoso, A.A. and Kosmatopoulos, K. (2002) HER-2/neu and hTERT 5 cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. J Immunol, 168, 5900-5906.

Tourdot, S. and Gould, K.G. (2002) Competition between MHC class I alleles for cell surface expression alters CTL responses to influenza A virus. J Immunol, 169, 5615-5621.

Valmori, D., Gervois, N., Rimoldi, D., Fonteneau, J.F., Bonelo, A., Lienard, D., Rivoltini, L., Jotereau, F., Cerottini, J.C. and Romero, P. (1998) Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201-restricted CTL specific for the 10 immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide. J Immunol, 161, 6956-6962.

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. and Kast, W.M. (2001) Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. J Immunol, 166, 5366-5373.

15 **LISTADO DE SECUENCIAS**

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

20 <120> IDENTIFICACIÓN, OPTIMIZACIÓN Y USO DE EPÍTOPOS HLA-A24 CRÍPTICOS PARA INMUNOTERAPIA

<130> VMAahF1788/4

25 <160> 190

<170> Patentin versión 3.3

<210> 1

30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

35 <223> péptido

<400> 1

Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His
1 5

40 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 2

Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His
1 5

50 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> péptido

ES 2 608 715 T3

<400> 3

Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
1 5

5 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 4

Pro Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met
1 5

15 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 5

Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu
1 5

25 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 6

Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu
1 5

<210> 7
<211> 9
40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

45 <400> 7

Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
1 5

<210> 8
50 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 608 715 T3

<223> péptido
 <400> 8
 5 Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> péptido
 <400> 9
 15 Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 25 <400> 10
 Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 35 <400> 11
 Lys Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr Leu
 1 5
 <210> 12
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> péptido
 <400> 12
 Arg Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala Leu
 1 5
 50 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

<400> 13
5 Arg Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> péptido
15 <400> 14

Arg Tyr Gly Lys Gly Trp Asp Leu Leu
1 5

<210> 15
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
25 <400> 15

Arg Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu
1 5

<210> 16
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> péptido

<400> 16

Arg Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Leu
1 5

40 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 17

Arg Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Leu
1 5
50

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

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

5 <400> 18

Arg Tyr Glu phe Leu Trp Gly Pro Leu

1 5

10 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido

<400> 19

Arg Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Leu
1 5

20 <210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> péptido

<220>

30 <221> VARIANTE
<222> (1) .. (1)
<223> sustituir = cualquier aminoácido

<220>

35 <221> VARIANTE
<222> (3)..(7)
<223> sustituir = cualquier aminoácido

<220>

40 <221> VARIANTE
<222> (8)..(11)
<223> sustituir = cualquier aminoácido o ninguno

<220>

45 <221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> sustituir = cualquier aminoácido excepto "Leu" o "Phe" o "Ile" si (1) = "Arg" o "Lys"

<400> 20

50 Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr Ala Ala Ala His
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

ES 2 608 715 T3

<223> péptido

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (1) .. (1)

<223> substituir = cualquier aminoácido excepto "Arg" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (3)..(7)

<223> substituir = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (8) .. (11)

<223> substituir = cualquier aminoácido o ninguno

<400> 21

Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Ala Ala Leu
1 5 10

20

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido

<220>

30 <221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> substituir = cualquier aminoácido excepto "Arg" o "Lys"

<220>

35 <221> VARIANTE

<222> (3)..(7)

<223> substituir = cualquier aminoácido

<220>

40 <221> VARIANTE

<222> (8)..(11)

<223> substituir = cualquier aminoácido o ninguno

<220>

45 <221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> substituir = cualquier aminoácido excepto "Asp" o "Glu" o "Gly" o "His" o "Pro" o "Gln" o "Arg" o "Lys"

<400> 22

Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Ala Ala Leu
1 5 10

50

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

ES 2 608 715 T3

<223> péptido

<400> 23

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido

<400> 24

Tyr Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

15

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 25

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

<210> 26

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

35

<400> 26

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

<210> 27

40 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> péptido

<400> 27

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

50 <210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

<400> 28

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

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

15 <400> 29

Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

<210> 30
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 30

Tyr Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

<210> 31
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> péptido

<400> 31

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

40 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 32

45 Tyr Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

50 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

5 <400> 33

Lys Met Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 34
<211> 10

10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

15

<400> 34

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

<210> 35

20 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

25

<400> 35

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

<210> 36
<211> 8

30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

35

<400> 36

Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 37
<211> 8

40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

45

<400> 37

Tyr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 38
<211> 8

50 <212> PRT

ES 2 608 715 T3

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 38

Tyr Met Glⁿ Val¹ Pro Phe Ser Val⁵

<210> 39

10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> péptido

<400> 39

Val¹ Leu Tyr Arg Tyr⁵ Gly Ser Phe Ser Val¹⁰

20

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido

<400> 40

Tyr Leu Tyr Arg Tyr⁵ Gly Ser Phe Ser Val¹⁰

30

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 41

Leu Leu Asp Gly¹ Thr⁵ Ala Thr Leu Arg Leu¹⁰

40

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

45

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

50

<400> 42

Tyr Leu Asp Gly¹ Thr⁵ Ala Thr Leu Arg Leu¹⁰

55

<210> 43

ES 2 608 715 T3

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

5 <220>
<223> péptido

<400> 43

Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu
1 5

10 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido

<400> 44

Tyr Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu
1 5

20 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

30 <400> 45

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

40 <400> 46

Tyr Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 47
45 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> péptido

<400> 47

Cys Leu Thr ser Thr val Gln Leu val
1 5

ES 2 608 715 T3

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> péptido

<400> 48

10

Tyr Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

20 <400> 49

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Trp
1 5

<210> 50
<211> 8
25 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

30

<400> 50

Tyr Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Trp
1 5

<210> 51
35 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> péptido

<400> 51

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

45 <210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> péptido

<400> 52

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

ES 2 608 715 T3

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

10 <400> 53

Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
1 5

<210> 54
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

20

<400> 54

Tyr Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
1 5

<210> 55
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> péptido

<400> 55

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val
1 5

35 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 56

Tyr Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val
1 5

45

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> péptido

<400> 57

ES 2 608 715 T3

Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val
1 5

<210> 58
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
10
<400> 58

Tyr Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val
1 5

<210> 59
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> péptido
<400> 59

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

25 <210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> péptido
<400> 60

Tyr Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

35 <210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido
<400> 61

Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu
1 5

45
50 <210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

ES 2 608 715 T3

<400> 62

Tyr Leu Ile His His Asn Thr His Leu
1 5

<210> 63

5 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 63

Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
1 5

15 <210> 64

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

20 <220>

<223> péptido

<400> 64

Tyr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
1 5

25

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> péptido

<400> 65

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val
1 5

35

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

45 <400> 66

Tyr Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val
1 5

<210> 67

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

<220>
<223> péptido

ES 2 608 715 T3

<400> 67

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

5 <210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 68

Tyr Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

15 <210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 69

Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
1 5

25 <210> 70
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 70

Tyr Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val
1 5

40 <210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

45 <400> 71

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

50 <210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 608 715 T3

<223> péptido

<400> 72

5 Thr I|e Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Gly
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 73

15 Thr va| Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 74

Tyr va| Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly va|
1 5 10

<210> 75
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 75

Lys va| Lys va| Leu Gly ser Gly Ala
1 5

40 <210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 76

50 Lys Leu Lys va| Leu Gly ser Gly va|
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
55 <213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

5 <400> 77

Arg Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

<210> 78
<211> 9

10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

15 <400> 78

Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> péptido

<400> 79

Tyr Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Val
1 5

30 <210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> péptido

<400> 80

40 Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

50 <400> 81

Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu
1 5

<210> 82
<211> 9

ES 2 608 715 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> péptido

<400> 82

Tyr Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val
1 5

10 <210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido

<400> 83

Asp Val Trp ser Tyr Gly Val Thr Val
1 5

20
<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25
<220>
<223> péptido

<400> 84

Asp Val Trp ser Tyr Gly Val Thr Ile
1 5

30
<210> 85
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

40 <400> 85

Tyr Val Trp ser Tyr Gly Val Thr Val
1 5

<210> 86
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

50
<400> 86

Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
1 5

<210> 87

ES 2 608 715 T3

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

5 <220>
 <223> péptido

<400> 87

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

10 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> péptido

<400> 88

Tyr Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu
 1 5

<210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

30 <400> 89

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

<210> 90
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

40 <400> 90

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

<210> 91
 45 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> péptido

<400> 91

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

ES 2 608 715 T3

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

10 <400> 92

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

<210> 93
<211> 10
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

20

<400> 93

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

<210> 94
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> péptido

<400> 94

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly
1 5

35 <210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 95

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp
1 5

45

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> péptido

<400> 96

ES 2 608 715 T3

Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Val
1 5

<210> 97
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> péptido
<400> 97

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

<210> 98
15 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> péptido
<400> 98

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

25 <210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> péptido
<400> 99

Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

35 <210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido
<400> 100

Tyr Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val
1 5

45 <210> 101
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

ES 2 608 715 T3

<400> 101

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

<210> 102

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido

<400> 102

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

15 <210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 103

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly
1 5

25

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> péptido

<400> 104

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu
1 5

35

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

40 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

45 <400> 105

Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
1 5

<210> 106

<211> 9

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

ES 2 608 715 T3

<400> 106
Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Leu
1 5

5 <210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido
<400> 107
Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5

15 <210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> péptido
<400> 108
Ala Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5

30 <210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
35 <223> péptido
<400> 109
Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5

40 <210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> péptido
<400> 110
Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5

50 <210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

<400> 111

5

Ala Tyr Ile Asp Asn Tyr Asn Lys Phe
1 5

<210> 112
<211> 13
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

15 <400> 112

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

<210> 113
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

25

<400> 113

Ser Tyr Leu Asp Ser Gly Ile His Phe
1 5

<210> 114
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> péptido

<400> 114

Asn Tyr Asn Asn Phe Tyr Arg Phe Leu
1 5

40 <210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
45 <223> péptido

<400> 115

Glu Tyr Ser Lys Glu Cys Leu Lys Glu Phe
1 5 10

50

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

5 <400> 116

Glu Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Lys Ile
1 5

<210> 117
<211> 9

10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

15 <400> 117

Glu Tyr Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile
1 5

<210> 118
<211> 9

20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 118

Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe
1 5

<210> 119
<211> 9

30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

35 <400> 119

Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu
1 5

<210> 120
<211> 9

40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

45 <400> 120

<210> 121
<211> 9

50 <212> PRT

Asn Tyr Lys Arg Cys Phe Pro Val Ile
1 5

ES 2 608 715 T3

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

5

<400> 121

Leu Tyr Ala Thr Val Ile His Asp Ile
1 5

<210> 122

10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> péptido

<400> 122

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe
1 5 10

20

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido

<400> 123

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu
1 5

30

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> péptido

<400> 124

Val Tyr Phe Phe Leu Pro Asp His Leu
1 5

40

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

45

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

50

<400> 125

Leu Tyr Ser Ala Cys Phe Trp Trp Leu
1 5

<210> 126

<211> 9

ES 2 608 715 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> péptido

<400> 126

Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe
1 5

10 <210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido

<400> 127

Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
1 5

20 <210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> péptido

<400> 128

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu
1 5

30 <210> 129
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

40 <400> 129

Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
1 5

<210> 130
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

50 <400> 130

Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe
1 5

ES 2 608 715 T3

<210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> péptido

 <400> 131
 10 Asn Ser Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu
 1 5

 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 132
 Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
 1 5

 <210> 133
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 133
 Cys Tyr Gly Asp Met Glu Asn Lys Leu
 1 5

 <210> 134
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> péptido

 <400> 134
 Ala Val Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu
 1 5

 45 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> péptido

 <400> 135
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

ES 2 608 715 T3

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

10 <400> 136

His Tyr Met Leu Lys His Leu Val Trp
1 5

<210> 137
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

20

<400> 137

Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp
1 5

<210> 138
25 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> péptido

<400> 138

Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

35 <210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 139

Leu Tyr Cys Val His Gln Lys Ile
1 5

45

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> péptido

<400> 140

ES 2 608 715 T3

Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu
1 5

<210> 141
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
10
<400> 141

Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu
1 5

15
<210> 142
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> péptido
<400> 142

Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu
1 5

25
<210> 143
<211> 10
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> péptido
35 <400> 143

Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu
1 5 10

<210> 144
<211> 10
40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
45
<400> 144

Leu Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Arg Ser Leu
1 5 10

<210> 145
50 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 608 715 T3

<223> péptido

<400> 145

Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu
1 5

5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido

<400> 146

Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu
1 5

15

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 147

Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu
1 5

<210> 148

<211> 8

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

35

<400> 148

Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile
1 5

<210> 149

40 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> péptido

<400> 149

Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr
1 5 10

50 <210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

<400> 150

5

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu
1 5

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

15 <400> 151

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 152
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

25

<400> 152

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 153
30 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> péptido

<400> 153

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
1 5 10

40 <210> 154
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

<400> 154

50

Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 155
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

5 <400> 155

Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 156
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

15
<400> 156

Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile
1 5

<210> 157
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> péptido
<400> 157

Ser Tyr Arg Arg Leu Arg Asp Leu Leu
1 5

30 <210> 158
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> péptido
<400> 158

Thr Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu
1 5

40
<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> péptido
<400> 159

50 His ser Gln Arg Arg Gln Asp Ile Leu
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT

ES 2 608 715 T3

<213> Artificial

<220>
<223> péptido

5 <400> 160

Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Ile
1 5

<210> 161
10 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> péptido

<400> 161

Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr
1 5

20 <210> 162
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> péptido

<400> 162

Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr
1 5 10

30 <210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> péptido

<400> 163

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp
1 5

40 <210> 164
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

50 <400> 164

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe
1 5 10

<210> 165
<211> 10

ES 2 608 715 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> péptido
<400> 165

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Tyr
1 5 10

10 <210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido
<400> 166

Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Met
1 5

20 <210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> péptido
<400> 167

Ala Phe His His Val Ala Arg Glu Leu
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

40 <400> 168

Ser Tyr Leu Asp Ser Gly Ile His Phe
1 5

<210> 169
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

50 <400> 169

Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
1 5

ES 2 608 715 T3

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> péptido

<400> 170
10 Cys Tyr Gly Asp Met Glu Asn Lys Leu
1 5

<210> 171
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
20
<400> 171
Ala Val Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu
1 5

25 <210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> péptido

<400> 172
35 Asn Tyr Asn Asn Phe Tyr Arg Phe Leu
1 5

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
40
<220>
<223> péptido

<400> 173
45 Glu Tyr Ser Lys Glu Cys Leu Lys Glu Phe
1 5 10

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> péptido
55 <400> 174

ES 2 608 715 T3

Glu Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Lys Ile

1

5

5 <210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 175

Glu Tyr Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile
1 5

15

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> péptido

25 <400> 176

Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe
1 5

<210> 177
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

35

<400> 177

Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu
1 5

<210> 178
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
45 <223> péptido

<400> 178

Asn Tyr Lys Arg Cys Phe Pro Val Ile
1 5

50 <210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>

ES 2 608 715 T3

<223> péptido

<400> 179

Leu Tyr Ala Thr Val Ile His Asp Ile
1 5

5

<210> 180
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> péptido

<400> 180

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe
1 5 10

15

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> péptido

25 <400> 181

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> péptido

35

<400> 182

Val Tyr Phe Phe Leu Pro Asp His Leu
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> péptido

45

<400> 183

Leu Tyr Ser Ala Cys Phe Trp Trp Leu
1 5

50

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
 <223> péptido
 <400> 184
 5 Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe
 1 5
 <210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 15 <400> 185
 Arg Tyr Glu Leu Asp Pro Lys Phe Ile
 1 5
 <210> 186
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 25 <400> 186
 Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu
 1 5
 <210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> péptido
 <400> 187
 Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
 1 5
 <210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 <400> 188
 50 Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe
 1 5
 <210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 608 715 T3

<220>
<223> péptido

5 <400> 189

Asn ser Gln Pro Val Trp Leu Cys Leu
1 5

<210> 190
<211> 9

10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

15
<400> 190

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención de un epítipo restringido en HLA-A*2402 capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 de un antígeno, que comprende las 5 etapas de
- (i) selección, en dicho antígeno, de un péptido de 9 a 11 aminoácidos que tienen una tirosina en posición 2 y uno o más aminoácidos desfavorables en una o varias posiciones de anclaje secundarias, seleccionados de entre el grupo que consiste en una prolina en posición 1 y un ácido glutámico, un ácido aspártico, una glicina, una histidina, una 10 prolina, una glutamina, una arginina y una lisina en posición en el extremo C;
- (ii) prueba, en ratones transgénicos HLA-A*2402, de la inmunogenicidad del péptido seleccionado en la etapa (i);
- (iii) selección de dicho péptido si no consigue inducir una respuesta inmunitaria específica en ratones transgénicos HLA-A*2402
- (iv) para cada epítipo natural seleccionado en la etapa (iii), obtención de un epítipo optimizado aumentando su 15 inmunogenicidad, sustituyendo el residuo en el extremo N de dicho epítipo por una arginina o una lisina, y/o sustituyendo el residuo en el extremo C de dicho epítipo por una leucina o una isoleucina o una fenilalanina, preferentemente por una leucina;
- (v) prueba de la inmunogenicidad de cada epítipo optimizado obtenido en la etapa (iv), en ratones transgénicos HLA-A*2402, y selección de los que son inmunógenos;
- 20 (vi) para cada epítipo seleccionado en la etapa (v), prueba para determinar si los LTC generados contra el epítipo optimizado también reconocen su epítipo natural semejante, y selección de aquellos para los que la prueba es positiva.
2. Un péptido aislado que consiste en un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402, donde dicho 25 péptido aislado se selecciona de entre el grupo que consiste en PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1); PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2); PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4); TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6).
3. Un péptido aislado que consiste en un epítipo inmunógeno restringido en HLA-A*2402, donde dicho 30 péptido aislado se selecciona de entre el grupo que consiste en KYGVLLKTL (SEQ ID NO: 11); RYMRQFVAL (SEQ ID NO: 12); RYVSRLGI (SEQ ID NO: 13); RYGKGWDL (SEQ ID NO: 14); RYLVQVQAL (SEQ ID NO: 15); y RYWELSNHL (SEQ ID NO: 16).
4. Un polipéptido quimérico que comprende varios epítipos diferentes o una repetición de un único 35 epítipo, **caracterizado porque** comprende uno, dos, tres o más epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402 seleccionados de entre el grupo que consiste en PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1); PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2); PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4); TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6).
5. Un polipéptido quimérico que comprende varios epítipos diferentes, **caracterizado porque** 40 comprende dos, tres o más epítipos crípticos restringidos en HLA-A*2402 seleccionados de entre el grupo que consiste en PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1); PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2); PYVSRLGI (SEQ ID NO: 3); PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4); TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6).
6. Un polipéptido quimérico que comprende varios epítipos diferentes o una repetición de un único 45 epítipo, **caracterizado porque** comprende uno, dos, tres o más epítipos inmunógenos restringidos en HLA-A*2402 de acuerdo con la reivindicación 3.
7. Una molécula de ácido nucleico aislada diseñada para provocar la expresión de un epítipo críptico 50 restringido en HLA-A*2402 de acuerdo con la reivindicación 2, un epítipo inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 3, o un polipéptido quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. Una composición farmacéutica que comprende al menos, como principio activo, un epítipo críptico 55 restringido en HLA-A*2402 de acuerdo con la reivindicación 2, o un polipéptido de epítipo inmunógeno de acuerdo con la reivindicación 3, o un polipéptido quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, que es una vacuna.
10. Un kit de partes que comprende, en recipientes separados:

- (i) un primer péptido que comprende una secuencia de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402, y
- (ii) un segundo péptido que comprende una secuencia que consiste en un epítipo inmunógeno restringido en HLA-A*2402,

5 donde dichos péptidos primero y segundo se seleccionan de entre el grupo que consiste en los siguientes pares de péptidos:

- PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1) y KYGVLLKTL (SEQ ID NO: 11);
- PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2) y RYMRQFVAL (SEQ ID NO: 12);
- 10 - PYVSRLGI (SEQ ID NO: 3) y RYVSRLGI (SEQ ID NO: 13);
- PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4) y RYGKGWDL (SEQ ID NO: 14);
- TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y RYLVQVQAL (SEQ ID NO: 15); y
- PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6) y RYWELSNHL (SEQ ID NO: 16).

15 11. Un kit de partes que comprende, en recipientes separados:

- (i) un primer péptido que comprende una secuencia de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402, y
- (ii) un segundo péptido que comprende una secuencia que consiste en un epítipo inmunógeno restringido en HLA-A*2402 obtenido del epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 recogido en (i) por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1,

20 donde dicho primer péptido es un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, y dicho segundo péptido es un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 6, donde al menos un epítipo inmunógeno comprendido en el segundo péptido se asemeja a al menos un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402

25 comprendido en el primer péptido.

12. Un kit de partes que comprende, en recipientes separados:

- (i) un primer péptido que comprende una secuencia de un epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 seleccionado de entre el grupo que consiste en PYGVLLKTH (SEQ ID NO: 1); PYMRQFVAH (SEQ ID NO: 2); PYVSRLGI (SEQ ID NO: 3); PYGKGWDLM (SEQ ID NO: 4); TYLVQVQAL (SEQ ID NO: 5) y PYWELSNHE (SEQ ID NO: 6), y
- (ii) un segundo péptido que comprende una secuencia que consiste en un epítipo inmunógeno restringido en HLA-A*2402 obtenido del epítipo críptico restringido en HLA-A*2402 recogido en (i) por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho segundo péptido es un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 6.

35 13. Un péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, o un polipéptido quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso como un medicamento para inmunoterapia preventiva o curativa.

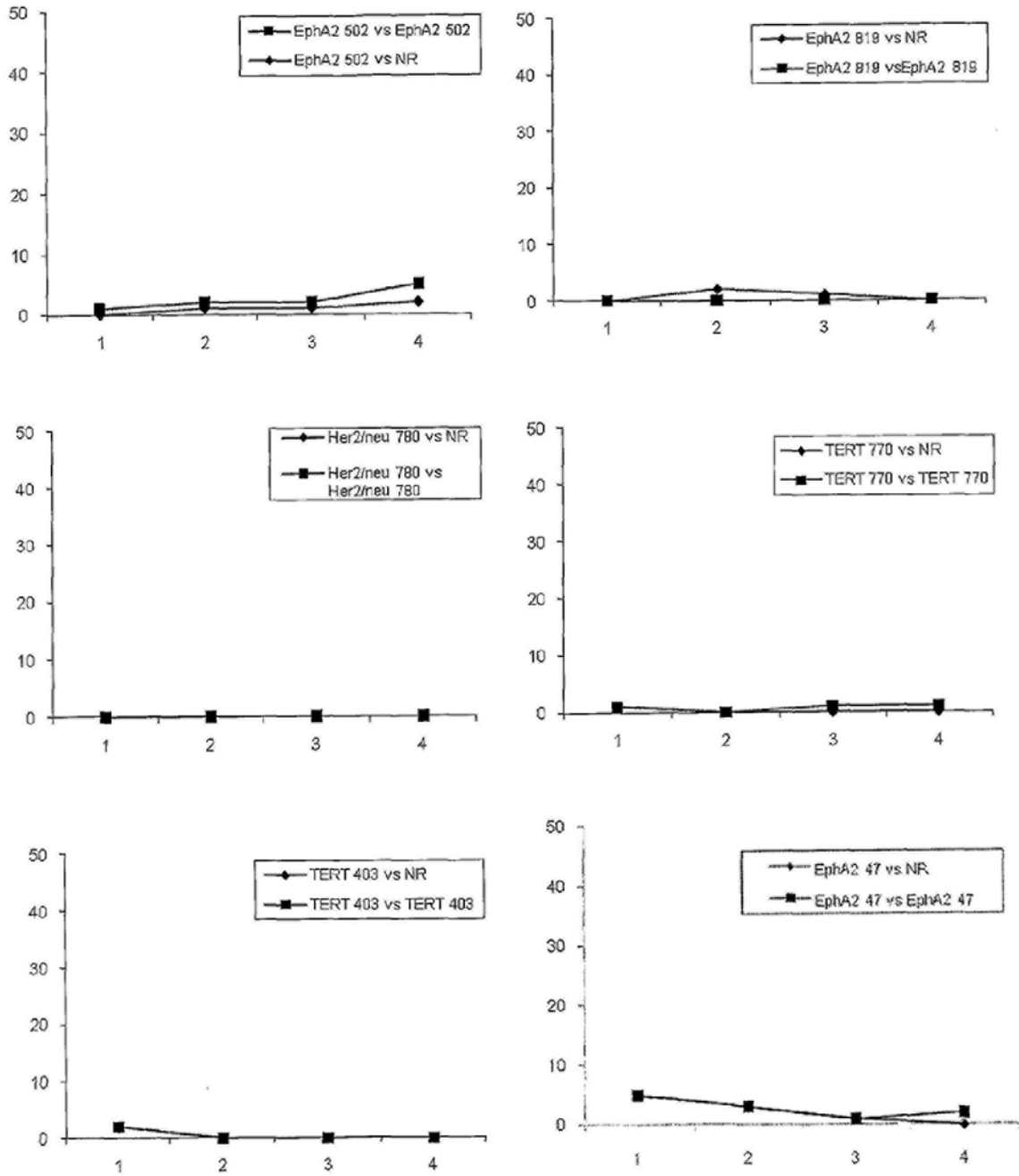


Figura 1

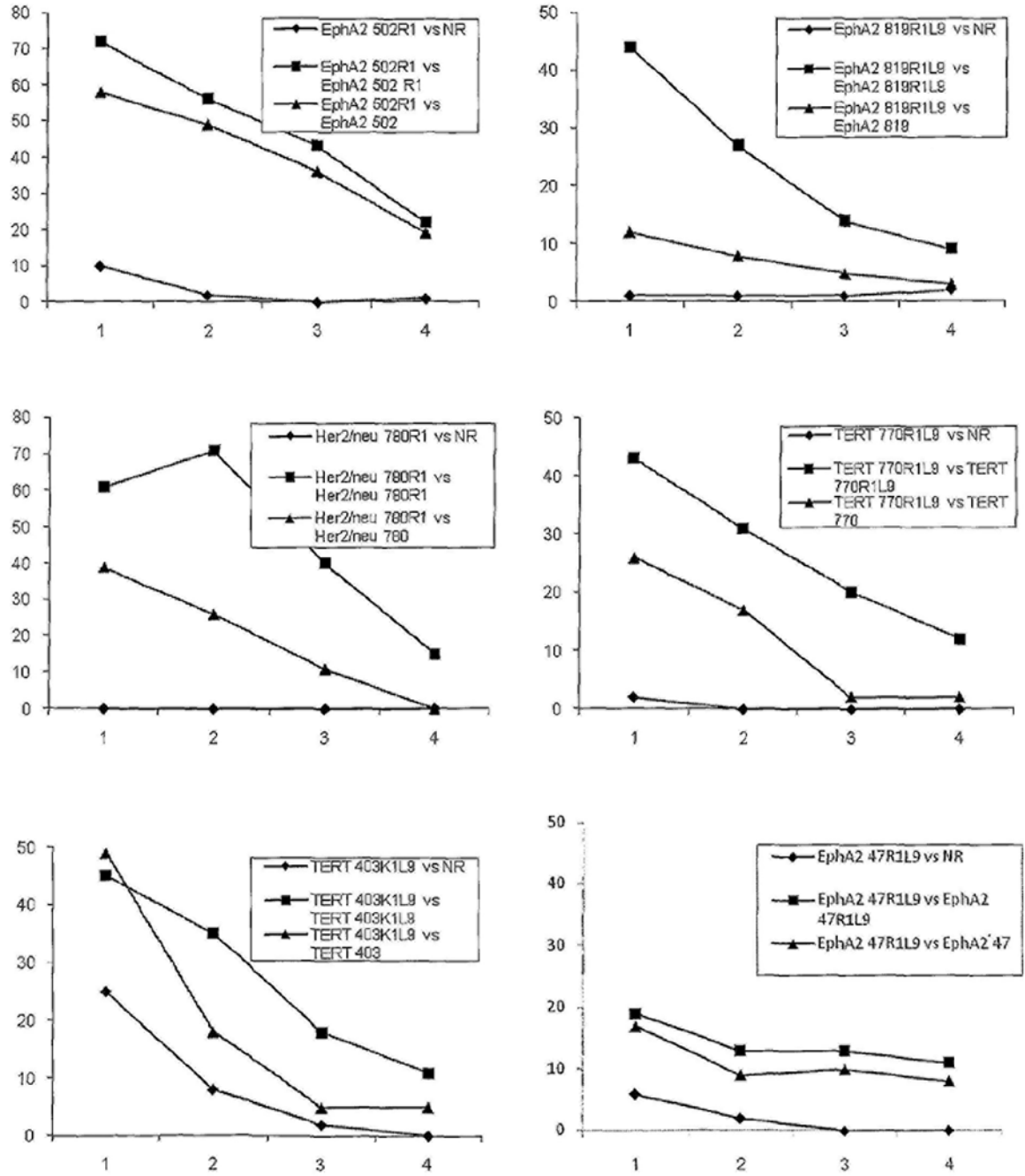


Figura 2