

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 277**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2011 PCT/JP2011/065033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO2012005161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11803495 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2591799**

54 Título: **Vacuna peptídica contra el cáncer**

30 Prioridad:

**07.07.2010 JP 2010154921**

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

**28.06.2017**

73 Titular/es:

**GREEN PEPTIDE CO., LTD. (100.0%)  
No. 402, Fukuoka Bio Incubation Center 1-1,  
Hyakunen Koen Kurume-shi  
Fukuoka 839-0864, JP**

72 Inventor/es:

**ITOH, KYOGO y  
YAMADA, AKIRA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 620 277 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

Vacuna peptídica contra el cáncer

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una composición como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas que comprende un grupo de péptidos derivados de antígenos tumorales para su uso en la inmunoterapia del cáncer como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

10

**Técnica antecedente**

En el mundo, aproximadamente 10 millones de personas desarrollan nuevos cánceres cada año, y aproximadamente 6 millones de estas mueren. En Japón, el número de pacientes que desarrollan cáncer por año es aproximadamente de 600.000 y aproximadamente 330.000 personas o más mueren de cáncer anualmente, lo que representa aproximadamente el 30% de la tasa total de muerte. Las estrategias terapéuticas principales que se llevan a cabo de manera convencional para dicho cáncer son la cirugía, radioterapia, quimioterapia, y similares. En los últimos años, se han desarrollado activamente fármacos de anticuerpos que se dirigen a moléculas tales como un receptor expresado en las células cancerosas y se utilizan clínicamente. Sin embargo, estas estrategias terapéuticas tienen un efecto temporal pero no detienen la progresión del cáncer. Por eso, se han llevado a cabo la investigación y el desarrollo de inmunoterapia como estrategia terapéutica de nueva generación que tiene un nuevo mecanismo de acción.

15

20

25

En la inmunoterapia, la terapia celular que utiliza células presentadoras de antígenos tumorales (células dendríticas) (Provenge de Dendreon, EE. UU., o similares) ha estado a la cabeza en todo el mundo; se anunció un informe preliminar de los resultados del ensayo crucial P-III en abril de 2009; y se obtuvo la aprobación por la FDA en los EE. UU. en 2010.

30

Para la terapia vacunal que utiliza un antígeno como agente medicinal, se han llevado a cabo ensayos en la prevención de la recaída postoperatoria de cáncer de células no pequeñas utilizando el antígeno MAGE-A3 descubierto en el Instituto Ludwig y el desarrollo de una vacuna peptídica contra un tumor cerebral (glioblastoma) utilizando EGFRVIII.

35

En cuanto a las vacunas que tienen la intención de prevenir el cáncer, Merck y Co., Inc. y GSK Co., Ltd. han obtenido cada uno la aprobación de vacunas preventivas contra el cáncer de cuello uterino.

40

Sin embargo, la terapia celular como una de las inmunoterapias que se encuentran en cabeza actualmente tiene un problema ya que prácticamente solo se puede llevar a cabo en instituciones equipadas debido a la necesidad absoluta células recolectadas de los pacientes. La vacuna peptídica derivada de MAGE-A3 o EGFRVIII actualmente en desarrollo tiene forma de un fármaco en el que se administra el mismo antígeno a todos los pacientes; sin embargo, como el patrón de expresión proteica de las células cancerosas varía en cada paciente (Bibliografía No Patente 52), puede que las células cancerosas no expresen el antígeno administrado en algunos pacientes, en cuyo caso probablemente no se puede esperar un efecto suficiente. De hecho, se ha presentado un informe en el que dicha inmunoterapia no tiene una tasa de eficacia suficiente (Bibliografía No Patente 51).

45

En consecuencia, los presentes inventores han enfocado la atención en el hecho de que las células cancerosas de cada paciente tienen una población heterogénea y el antígeno que produce una respuesta inmunitaria contra el cáncer es diferente en cada paciente, y han intentado la investigación y desarrollo de la denominada "vacuna peptídica contra el cáncer a medida", para la que se identifica una pluralidad de antígenos peptídicos tumorales, se determina una respuesta inmunitaria de cada péptido del grupo de péptidos para cada paciente, y se administra el péptido óptimo que proporciona una respuesta inmunitaria.

50

Para la inmunoterapia del cáncer, se considera que un antígeno que se expresa en una célula cancerosa se presenta sobre la superficie celular por medio de una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) y un linfocito T citotóxico (CTL) que lo reconoce, daña la célula cancerosa para detener la progresión del cáncer. Los presentes inventores identificaron varios cientos de péptidos antigénicos tumorales y llevaron a cabo estudios intensivos sobre un método en el cual se utilizaron aproximadamente 80 de estos péptidos para medir la reactividad de los CTL presentes en la sangre periférica de un paciente a los péptidos, y el péptido óptimo se seleccionaba y se administraba (Bibliografía de Patentes 1 a 3).

60

Sin embargo, para aplicarlo en un producto farmacéutico, dicho método tiene el problema de que es menos fácil comercializarlo debido a que el gran número de péptidos hace la producción y desarrollo del mismo muy costoso. Además, en un establecimiento médico actual, también se tiene el problema de que es complicado el proceso desde la selección a la administración del péptido, tal como el aumento de carga de almacenamiento de péptidos y el control de los péptidos con el fin de evitar la mezcla de los mismos. Por otra parte, también existe el problema de que la disminución de péptidos da como resultado la incapacidad para seleccionar el péptido óptimo en algunos

65

pacientes y disminuye el efecto del agente medicinal. La selección de péptidos por la medición utilizando CTL tiene problemas, tales como que toma tiempo y es difícil una medición que garantice una reproductibilidad suficiente.

### Listado de citas

5

#### Bibliografía de Patentes

- Bibliografía de Patente 1: documento WO2005/041982  
 Bibliografía de Patente 2: documento WO2005/123122  
 10 Bibliografía de Patente 3: documento WO03/025569  
 Bibliografía de Patente 4: documento JP11-318455A  
 Bibliografía de Patente 5: documento WO00/12701  
 Bibliografía de Patente 6: documento WO01/011044  
 Bibliografía de Patente 7: documento WO03/050140  
 15 Bibliografía de Patente 8: documento JP2005-162679A  
 Bibliografía de Patente 9: documento JP2005-170799A  
 Bibliografía de Patente 10: documento WO2005/071075  
 Bibliografía de Patente 11: documento JP2007-145715A  
 Bibliografía de Patente 12: documento WO2009/038026  
 20 Bibliografía de Patente 13: documento JP2003-000270A

#### Bibliografía No Patentes

- 25 Bibliografía No Patente 1: Nakao M, Shichijo S, Imaizumi T, Inoue Y, Matsunaga K, Yamada A, Kikuchi M, Tsuda N, Ohta K, Takamori S, Yamana H, Fujita H, e Itoh K. Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J Immunol.* 164:2565-2574, 2000.
- Bibliografía No Patente 2: Yang D, Nakao M, Shichijo S, Sasatomi T, Takasu H, Matsumoto H, Mori K, Hayashi A, Yamana H, Shirouzu K, e Itoh K. Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res.* 59:4056-4063, 1999.
- Bibliografía No Patente 3: Harashima N, Tanaka K, Sasatomi T, Shimizu K, Miyagi Y, Yamada A, Tamura M, Yamana H, Itoh K, y Shichijo S. Recognition of the Lck tyrosine kinase as a tumor antigen by cytotoxic T lymphocytes of cancer patients with distant metastases. *Eur J Immunol.* 31:323-332, 2001.
- 35 Bibliografía No Patente 4: Inoue Y, Takaue Y, Takei M, Kato K, Kanai S, Harada Y, Tobisu K, Noguchi M, Kakizoe T, Itoh K, y Wakasugi H. Induction of tumor specific cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer using prostatic acid phosphatase derived HLA-A2402 binding peptide. *J Urol.* 166:1508-1513, 2001.
- Bibliografía No Patente 5: Harada M, Kobayashi K, Matsueda S, Nakagawa M, Noguchi M, e Itoh K. Prostate-specific antigen-derived epitopes capable of inducing cellular and humoral responses in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate.* 57:152-159, 2003.
- 40 Bibliografía No Patente 6: Kobayashi K, Noguchi M, Itoh K, y Harada M. Identification of a prostate-specific membrane antigen-derived peptide capable of eliciting both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Cancer Sci.* 94(7):622-627, 2003.
- Bibliografía No Patente 7: Ogata R, Matsueda S, Yao A, Noguchi M, Itoh K, y Harada M. Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2(EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate.* 60:273-281, 2004.
- Bibliografía No Patente 8: Yao A, Harada M, Matsueda S, Ishihara Y, Shomura H, Noguchi M, Matsuoka K, Hara I, Kamidono S, e Itoh K. Identification of parathyroid hormone-related protein-derived peptides immunogenic in human histocompatibility leukocyte antigen-A24+ prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 91:287-296, 2004.
- 50 Bibliografía No Patente 9: Shomura H, Shichijo S, Komatsu N, Matsueda S, Mine T, Rikimaru T, Sato Y, e Itoh K. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognised by both cellular and humoral immune responses in HLA- A24+ non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer.* 40:1776-1786, 2004.
- Bibliografía No Patente 10: Yamada A, Kawano K, Koga M, Matsumoto T, e Itoh K. Multidrug resistance-associated protein 3 is a tumor rejection antigen recognized by HLA-A2402-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 61: 6459-6466, 2001.
- 55 Bibliografía No Patente 11: Miyagi Y, Imai N, Sasatomi T, Yamada A, Mine T, Katagiri K, Nakagawa M, Muto A, Okouchi S, Isomoto H, Shirouzu K, Yamana H, e Itoh K. Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination with SART3 peptides. *Clin Can Res.* 7:3950-3962, 2001.
- Bibliografía No Patente 12: Hida N, Maeda Y, Katagiri K, Takasu H, Harada M, e Itoh K. A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the circulation. *Cancer Immunol Immunother.* 51:219-228, 2002.
- 60 Bibliografía No Patente 13: Komatsu N, Shichijo S, Maeda Y, e Itoh K. Measurement of interferon- $\gamma$  by high-throughput fluorometric microvolume assay technology (FMAT) system. *J Immunol Methods.* 263:169-176, 2002.
- Bibliografía No Patente 14: Noguchi M, Kobayashi K, Suetsugu N, Tomiyasu K, Suekane S, Yamada A, Itoh K, y Noda S. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate.* 57: 80-92, 2003.
- 65

- Bibliografía No Patente 15: Tanaka S, Harada M, Mine T, Noguchi M, Gohara R, Azuma K, Tamura M, Yamada A, Morinaga A, Nishikori M, Katagiri K, Itoh K, Yamana H, y Hashimoto T. Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancer based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors in the periphery. *J Immunother.* 26(4):357-366, 2003.
- 5 Bibliografía No Patente 16: Sato Y, Shomura H, Maeda Y, Mine T, Une Y, Akasaka Y, Kondo M, Takahashi S, Shinohara T, Katagiri K, Sato M, Okada S, Matsui K, Yamada A, Yamana H, Itoh K, y Todo S. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci.* 94(9):802-808, 2003.
- 10 Bibliografía No Patente 17: Noguchi M, Itoh K, Suekane S, Yao A, Suetsugu N, Katagiri K, Yamada A, Yamana H, y Noda S. Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci.* 95: 77-84, 2004.
- Bibliografía No Patente 18: Harada M, Gohara R, Matsueda S, Muto A, Oda T, Iwamoto Y, e Itoh K. In vivo evidence that peptide vaccination can induce HLA-DR-restricted CD4+ T cells reactive to a class I tumor peptide. *J Immunol.* 172: 2659-2667, 2004.
- 15 Bibliografía No Patente 19: Tsuda N, Mochizuki K, Harada M, Sukehiro A, Kawano K, Yamada A, Ushijima K, Sugiyama T, Nishida T, Yamana H, Itoh K, y Kamura T. Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J Immunother.* 27: 60-72, 2004.
- Bibliografía No Patente 20: Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gohara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K, y Yamana H. Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin Cancer Res.* 10: 929-937, 2004.
- 20 Bibliografía No Patente 21: Sato Y, Maeda Y, Shomura H, Sasatomi T, Takahashi M, Une Y, Kondo M, Shinohara T, Hida N, Katagiri K, Sato K, Sato M, Yamada A, Yamana H, Harada M, Itoh K, y Todo S. A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer.* 90: 1334-1342, 2004.
- 25 Bibliografía No Patente 22: Noguchi M, Itoh K, Suekane S, Morinaga A, Sukehiro A, Suetsugu N, Katagiri K, Yamada A, y Noda S. Immunological monitoring during combination of patient-oriented peptide vaccination and estramus-tine phosphate in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 60: 32-45, 2004.
- 30 Bibliografía No Patente 23: Mochizuki K, Sato Y, Tsuda N, Shomura H, Sakamoto M, Matsuura K, Ushijima K, Maeda Y, Katagiri K, Yamada A, Todo S, Kamura T, Harada M, e Itoh K. Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen. *Int J Oncol.* 25: 121-131, 2004.
- 35 Bibliografía No Patente 24: Takedatsu H, Okamura T, Yoshimoto K, Harada M, Koga M, Shichijo S, Sata M, e Itoh K. Expression of epithelial cancer-related antigens in hematologic malignancies applicable for peptide-based immunotherapy. *J Immunother.* 27(4): 289-297, 2004.
- Bibliografía No Patente 25: Komatsu N, Shichijo S, Nakagawa M, e Itoh K. New multiplexed flow cytometric assay to measure anti-peptide antibody: a novel tool for monitoring immune responses to peptides used for immunization. *Scand J Clin Lab Invest.* 64: 535-545, 2004.
- 40 Bibliografía No Patente 26: Noguchi M, Itoh K, Yao A, Mine T, Yamada A, Obata Y, Furuta M, Harada M, Suekane S, y Matsuoka K. Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24+ HRPC patients. *Prostate.* 63: 1-12, 2005.
- Bibliografía No Patente 27: Yajima N, Yamanaka R, Mine T, Tsuchiya N, Honma J, Sano M, Kuramoto T, Obata Y, Komatsu N, Arima Y, Yamada A, Shigemori M, Itoh K, y Tanaka R. Immunologic evaluation of personalized peptide vaccination for patients with advanced malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 11(16). 5900-5911, 2005
- 45 Bibliografía No Patente 28: Rosenberg SA, Yang JC, y Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10(9): 909-915, 2004.
- Bibliografía No Patente 29: Jaeckle KA, Hess KR, Yung WK, Greenberg H, Fine H, Schiff D, Pollack IF, y Kuhn J. Phase II evaluation of temozolomide and 13-cis-retinoic acid for the treatment of recurrent and progressive malignant glioma: a North American brain tumor consortium study. *J Clin Oncol.* 21(12): 2305-2311, 2003.
- 50 Bibliografía No Patente 30: Prados MD, Yung WK, Fine HA, Greenberg HS, Junck L, Chang SM, Nicholas MK, Robins HI, Mehta MP, Fink KL, Jaeckle KA, Kuhn J, Hess KR, Schold SC Jr., y North American Brain Tumor Consortium study. Phase 2 study of BCNU and temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme: North American brain tumor consortium study. *Neuro-oncol.* 6: 33-37, 2004.
- 55 Bibliografía No Patente 31: Rich J N, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, Koa JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Ushlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, y Friedman HS. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 22: 133-142, 2004.
- Bibliografía No Patente 32: Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller-M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, y Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10): 1036-1038, 2005.
- 60 Bibliografía No Patente 33: Yagoda A, y Petrylak D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer.* 71: 1098-1109, 1993.
- 65 Bibliografía No Patente 34: Scher HI, Mazumadar M, y Kelly WK. Clinical trials in relapsed prostate cancer: Defining

the target. *J Natl Cancer Inst.* 88(22): 1623-1634, 1996.

Bibliografía No Patente 35: de Voogt HJ, Smith PH, Pavone-Macaluso M, de Pauw M, y Suciú S. Cardiovascular side effects of diethylstilbestrol, cyproterone acetate, medroxyprogesterone acetate and estramustine phosphate used for treatment of advanced prostatic cancer. Results from European organization for research on treatment of cancer trials 30761 y 30762. *J Urol.* 135: 303-307, 1986.

Bibliografía No Patente 36: Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, y Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 351: 1502-1512, 2004.

Bibliografía No Patente 37: Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, y Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 351: 1513-1520, 2004.

Bibliografía No Patente 38: Kojima S, Suzuki H, Akakura K, Shimbo M, Ichikawa T, e Ito H. Alternative antiandrogens to treat prostate cancer relapse after initial hormone therapy. *J Urol.* 171:679-683. 2004.

Bibliografía No Patente 39: Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, y Rosenberg SA. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.* 56:4749-4757, 1996.

Bibliografía No Patente 40: Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, y White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 4(3):321-327, 1998.

Bibliografía No Patente 41: Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, y Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4(3):328-332, 1998.

Bibliografía No Patente 42: Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Boulond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, y Boon T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219-230, 1999.

Bibliografía No Patente 43: Slingluff CL Jr., Yamshchikov G, Neese P, Galavotti H, Eastham S, Engelhard VH, Kittleson D, Deacon D, Hibbitts S, Grosh WW, Petroni G, Cohen R, Wiernasz C, Patterson JW, Conway BP, y Ross WG. Phase 1 trial of a melanoma vaccine with gp100280-288 peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: Immunologic and clinical outcomes. *Clin Cancer Res.* 7:3012-3024, 2001.

Bibliografía No Patente 44: Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, Spears L, Jeffery G, Marty V, Groshen S, y Weber J. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund' s adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res.* 5:2756-2765, 1999.

Bibliografía No Patente 45: Jager E, Gnjjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, y Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(22):12198-12203, 2000.

Bibliografía No Patente 46: Tsugawa T, Kuwashima N, Sato H, Fellows-Mayle WK, Dusak JE, Okada K, Papworth GD, Watkins SC, Gambotto A, Yoshida J, Pollack IF, y Okada H. Sequential delivery of interferon-alpha gene and DCs to intracranial gliomas promotes an effective antitumor response. *Gene Ther.* 11:1551-8, 2004.

Bibliografía No Patente 47: The committee of brain tumor registry of Japan: Report of brain tumor registry of Japan (1969-1993) 10th edition. *Neurol medico-chirurgica* 40 (suppl), 2000.

Bibliografía No Patente 48: Kitamura T. Necessity of re-evaluation of estramustine phosphate sodium (EMP) as a treatment option for first-line monotherapy in advanced prostate cancer. *Int J Urology.* 8: 33-36, 2001.

Bibliografía No Patente 49: Noguchi M, Mine T, Yamada A, Obata Y, Yoshida K, Mizoguchi J, Harada M, Suekane S, Itoh K, y Matuoka K. Combination therapy of personalized peptide vaccination and low-dose estramustine phosphate for metastatic hormone refractory prostate cancer patients: an analysis of prognostic factors in the treatment. *Oncol Res.* 16:341-349, 2007.

Bibliografía No Patente 50: Murayama K, Kobayashi T, Imaizumi T, Matsunaga K, Kuramoto T, Shigemori M, Shichijo S, e Itoh K, . Expression of the SART3 tumor-rejection antigen in brain tumors and induction of cytotoxic T lymphocytes by its peptides. *J Immunother.* :23(5) 511-518, 2000.

Bibliografía No Patente 51: Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP, Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004 Sep; 10(9) : 909-15.

Bibliografía No Patente 52: Homma S, Komohara Y, Harada M, Saya H, Todo S, Itoh K, Noguchi M, Differential levels of human leukocyte antigen-class I, multidrug-resistance 1 and androgen receptor expressions in untreated prostate cancer cells: the robustness of prostate cancer. *Oncol Rep.* 2007 Aug;18(2):343-6

Bibliografía No Patente 53: Noguchi M, Kakuma T, Uemura H, Nasu Y, Kumon H, Hirao.Y, Moriya F, Suekane S, Matsuoka K, Komatsu N, Shichijo S, Yamada A, Itoh K, A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jul;59(7):1001-9. Epub 2010 Feb 10.

Bibliografía No Patente 54: Noguchi M, Yao A, Harada M, Nakashima O, Komohara Y, Yamada S, Itoh K, Matsuoka K, Immunological evaluation of neoadjuvant peptide vaccination before radical prostatectomy for patients with localized prostate cancer. *Prostate.* 2007 Jun 15;67(9):933-42.

Bibliografía No Patente 55: Naito M, Itoh K, Komatsu N, Yamashita Y, Shirakusa T, Yamada A, Moriya F, Ayatuka

H, Mohamed ER, Matsuoka K, Noguchi M. Dexamethasone did not suppress immune boosting by personalized peptide vaccination for advanced prostate cancer patients. Prostate. 2008 Dec 1;68(16):1753-62.

**Sumario de la invención**

5

**Problema técnico**

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una vacuna peptídica a medida contra el cáncer que sea capaz de administrar el péptido óptimo a cada paciente, que haya superado los problemas anteriores.

10

**Solución al problema**

Los presentes inventores llevaron a cabo estudios en un método para seleccionar péptidos midiendo los anticuerpos contra péptidos de la sangre periférica de los pacientes y descubrieron que se obtiene un efecto seleccionando péptidos que inducen una alta reactividad de anticuerpos, para cada paciente antes de la administración. Los estudios de los péptidos seleccionados y administrados les han hecho capaces de encontrar un grupo de péptidos óptimos que se pueden aplicar a varios pacientes como una vacuna peptídica a medida contra el cáncer.

15

Específicamente, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende de 8 a 13 péptidos de entre a) a d) a continuación:

20

- a) los péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, y 14;
- b) 5 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13;
- c) 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9; y
- d) 0 a 3 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10,

25

donde la composición se utiliza de manera que se miden los anticuerpos contra los péptidos respectivos de la sangre periférica de un paciente y se seleccionan 3 o 4 péptidos a los que son positivos los anticuerpos con el orden de medida de mayor a menor y se administran al paciente.

30

La presente invención también proporciona un método para seleccionar péptidos que se van a administrar para el tratamiento del cáncer, que comprende medir los anticuerpos en la sangre de un paciente contra los 8 a 13 péptidos de entre a) a d) a continuación.

35

- a) los péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, y 14;
- b) 5 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13;
- c) 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9; y
- d) 0 a 3 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10,

40

y seleccionar 3 o 4 péptidos a los que son positivos los anticuerpos en orden de mayor a menor.

**Efectos ventajosos de la invención**

La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas ejerce un efecto clínico excelente contra cánceres tales como el cáncer de próstata y el tumor cerebral, especialmente cánceres progresivos. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas es una composición que comprende un grupo de péptidos que tiene la ventaja de que se puede manejar de manera similar a los productos farmacéuticos convencionales en cuanto a que no necesitan un equipamiento especial cuando se utilizan.

45

**Breve descripción de los dibujos**

50

[Figura 1] La Figura 1 es un gráfico que muestra la relación entre la dosis de un péptido y el valor de IFN- $\gamma$  en pacientes con HRPC.

55

[Figura 2] La Figura 2 es un gráfico que muestra la relación entre la dosis de un péptido y el valor de FIU en pacientes con HRPC.

[Figura 3] La Figura 3 es un gráfico que muestra la relación entre la dosis de un péptido y el valor de IFN- $\gamma$  en pacientes de glioblastoma.

[Figura 4] La Figura 4 es un gráfico que muestra la relación entre la dosis de un péptido y el valor de FIU en pacientes con glioblastoma.

60

[Figura 5] La Figura 5 es un gráfico que muestra la relación entre el número de veces de administración del péptido y el valor de IFN- $\gamma$  en pacientes con HRPC.

[Figura 6] La Figura 6 es un gráfico que muestra la relación entre el número de veces de administración del péptido y el valor de FIU en pacientes con HRPC.

65

[Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra la relación entre el número de veces de administración del péptido y el valor de IFN- $\gamma$  en pacientes con glioblastoma.

[Figura 8] La Figura 8 es un gráfico que muestra la relación entre el número de veces de administración y el valor

de FIU en pacientes con glioblastoma.

[Figura 9] La Figura 9 es un gráfico que muestra la relación entre el número de veces de administración y los valores de IFN-γ para los péptidos seleccionados inicialmente y los péptidos re-seleccionados en pacientes con HRPC.

5

### Descripción de las realizaciones

La composición para su uso de acuerdo a las reivindicaciones adjuntas se caracteriza por las reivindicaciones adjuntas.

10

La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas comprende de 8 a 13 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1 y 3 a 14 que se muestran posteriormente como se definen por las reivindicaciones adjuntas. Estos péptidos son péptidos derivados de proteínas antigénicas expresadas por las células cancerosas (Bibliografías de Patente 4 a 13) y que son reconocidos por los CTL en un alelo HLA clase I, A-24, de manera restringida, para inducir actividad citotóxica contra las células cancerosas. En otras palabras la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas es una composición que se va a aplicar a pacientes con cánceres positivos a HLA-A24.

15

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia de aminoácidos
1	EGF-R-800	Asp-Tyr-Val-Arg-Glu-His-Lys-Asp-Asn-Ile
2	EZH2-735	Lys-Tyr-Val-Gly-Ile-Glu-Arg-Glu-Met
3	Lck-208	His-Tyr-Thr-Asn-Ala-Ser-Asp-Gly-Leu
4	Lck-486	Thr-Phe-Asp-Tyr-Leu-Arg-Ser-Val-Leu
5	5 Lck-488	Asp-Tyr-Leu-Arg-Ser-Val-Leu-Glu-Asp-Phe
6	MRP3-503	Leu-Tyr-Ala-Trp-Glu-Pro-Ser-Phe-Leu
7	MRP3-1293	Asn-Tyr-Ser-Val-Arg-Tyr-Arg-Pro-Gly-Leu
8	PAP-213	Leu-Tyr-Cys-Glu-Ser-Val-His-Asn-Phe
9	PSA-248	His-Tyr-Arg-Lys-Trp-Ile-Lys-Asp-Thr-Ile
10	PSMA-624	Thr-Tyr-Ser-Val-Ser-Phe-Asp-Ser-Leu
11	PTH-rP-102	Arg-Tyr-Leu-Thr-Gln-Glu-Thr-Asn-Lys-Val
12	SART2-93	Asp-Tyr-Ser-Ala-Arg-Trp-Asn-Glu-Ile
13	SART2-161	Ala-Tyr-Asp-Phe-Leu-Tyr-Asn-Tyr-Leu
14	SART3-109	Val-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leu

20 Los péptidos de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se pueden producir por un método convencional; ejemplos del mismo incluye los métodos que se describen en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc, New York, 1976; Pepuchido Gosei No Kiso To Jikken (Basis and Experiment for Peptide Synthesis) presentado por Maruzen Company Ltd., 1985 [en Japonés]; y Pepuchido Gosei (Peptide Synthesis), Iyakuhiin No Kaihatsu Zoku (Development of Pharmaceutical Product (Continuación)) vol. 14, expedido por Hirokawa Shoten, 1991 [en Japonés] pero no se limitan a estos y existen disponibles muchos métodos conocidos. La purificación y recuperación de un péptido se puede llevar a cabo por cromatografía de combinación en gel, cromatografía iónica en columna, cromatografía de afinidad, y similares. También se puede utilizar, por supuesto, un método que implique, basándose en la información de las secuencias de aminoácidos de los péptidos, la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para estos y utilizar los anticuerpos para la adsorción específica y la recuperación.

30

En la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, cada péptido se produce en forma de una solución antes de la administración a un paciente. Por lo tanto, la composición de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas comprende preferentemente péptidos formulados de manera que se puedan producir fácilmente en forma de una solución antes de la administración, aunque pueden comprender péptidos en polvo. Los métodos de formulación incluyen un método que implica una solución secada por congelación en la que cada péptido se disuelve en solución salina o una solución acuosa de un bicarbonato alcalinometálico al 1 a 6% p/v.

35

Como disolvente para disolver un péptido, se puede utilizar solución salina o una solución acuosa de un bicarbonato alcalinometálico al 1 a 6% p/v, o una mezcla de solución salina y solución acuosa de un bicarbonato alcalinometálico. Ejemplos de bicarbonatos alcalinometálicos incluyen bicarbonato de litio, bicarbonato sódico, y bicarbonato potásico, sin embargo, se prefiere particularmente el bicarbonato sódico. La cantidad de solución salina o la solución acuosa de bicarbonato alcalinometálico para disolver el péptido no se limita particularmente siempre que sea una cantidad que facilite la disolución uniforme del péptido; sin embargo, es preferible una cantidad de manera que la solución peptídica resultante tenga una concentración de péptido de 0,4% por masa, más preferentemente de 0,3 a 0,4% por masa.

45

La formulación se lleva a cabo preferentemente dispensando el péptido disuelto en un disolvente, en un vial antes de la liofilización. El disolvente en este caso es adecuadamente solución salina; sin embargo, para un péptido que se disuelve menos fácilmente en solución salina, se puede utilizar la solución acuosa de bicarbonato alcalinometálico al 1 a 6% p/v.

5 La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas comprende preferentemente péptidos que se han disuelto individualmente y secado por congelación uno por uno. Sin embargo, puede comprender 2 o más péptidos que se han disuelto juntos en un disolvente y se han secado por congelación o péptidos que se han mezclado después de la disolución y el secado por congelación de cada péptido.

10 Los péptidos formulados de esta manera se pueden administrar por disolución en agua de una pureza farmacéuticamente aceptable y en una cantidad de manera que sean isotónicos con el plasma.

15 La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas específicamente comprende de 8 a 13 péptidos de entre:

- a) los péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, y 14;
- b) 5 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13;
- c) 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9; y
- 20 d) 0 a 3 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10,

El número de péptidos que comprenden la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas no se limita particularmente siempre que esté en el intervalo de 8 a 13; un número más alto de péptidos es preferible ya que aumenta el número de pacientes y tipos de cáncer a los que se puede adaptar.

25 En un aspecto, la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas comprende de 8 a 13 péptido de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12, y 13 que se seleccionan a una alta frecuencia por ensayo con anticuerpos, 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9, y 0 a 3 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10.

30 En otro aspecto, la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas comprende de 8 a 10 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12, y 13 y 0 a 2 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 7 y 9.

35 En otro aspecto más, la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas comprende 8 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12, y 13.

40 La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas contiene péptidos derivados de antígenos que no son específicos para ciertas especies de cáncer, por ejemplo, péptidos derivados de SART-3, SART-2, MRP3 y similares; por lo tanto, no se limita particularmente el tipo de cáncer que se pretende. Ejemplos de los mismos incluyen cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de órganos hematopoyéticos, tumor cerebral, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, y cáncer esofágico. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se utiliza preferentemente para el cáncer de próstata y el tumor cerebral.

45 También se describe en el presente documento que cuando se dirige al cáncer de próstata, la composición puede comprender 7 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, y 12 o SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, y 13. Adicionalmente se describe en el presente documento que alternativamente, puede contener 6 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, y 11.

50 Cuando se dirige a un tumor cerebral, la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas puede comprender 8 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 11, 12, 13, y 7. También se describe en el presente documento que cuando se dirige a un tumor cerebral, la composición puede comprender 7 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 11, 12, y 13.

55 La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se caracteriza porque se utiliza de manera que los anticuerpos contra los péptidos que comprenden la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas presentes en la sangre periférica del paciente se miden para seleccionar los péptidos apropiados para cada paciente para su administración.

60 Se puede medir un anticuerpo en la sangre periférica de un paciente por un método de inmunoensayo conocido utilizando una reacción antígeno-anticuerpo tal como un método de medición que utiliza ELISA o múltiples tecnologías proporcionadas por Luminex Corporation. Específicamente, los péptidos que comprenden la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se inmovilizan cada uno en un soporte, y el anticuerpo de la sangre periférica de un paciente que se une al péptido inmovilizado, se detecta y se mide mediante fluorescencia o similares. una alta medida de los mismos indica una alta reactividad del péptido en el paciente, por lo tanto, el péptido se selecciona como un péptido que se va a administrar.

5 Cuando se puede medir la reacción de anticuerpos para múltiples péptidos en la sangre periférica de un paciente, se selecciona una pluralidad de péptidos en orden de reactividad del mayor al menor. El número de péptidos seleccionados es de 3 o 4, más preferentemente de 4. Se considera que cuanto mayor es el número de péptidos administrados al paciente se pueden inducir más especies de CTL y se pueden eliminar más eficazmente las células cancerosas que consisten en una población heterogénea. Por otra parte, la carga del paciente debido a la administración se reduce con la administración de menos péptidos. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, el número de péptidos administrados como se define en las reivindicaciones adjuntas es de 3 o 4.

10 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para seleccionar péptidos que se administran para el tratamiento del cáncer, que comprende la medición de los anticuerpos de la sangre periférica de un paciente contra 8 a 13 péptidos de a) a d):

- 15 a) los péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, y 14;
- b) 5 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13;
- c) 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9; y
- d) 0 a 3 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10,

y seleccionar 3 o 4 péptidos a los que son positivos los anticuerpos en orden de medida del mayor al menor.

20 En un aspecto, el método de la presente invención comprende la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 8 a 13 péptidos de las SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12 y 13, 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9, y 0 a 3 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10, y seleccionar 3 o 4 péptidos a los que los anticuerpos son positivos en el orden de medida del mayor al menor.

25 En otro aspecto, el método de la presente invención comprende la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 8 a 10 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12 y 13 y 0 a 2 péptidos que se seleccionan de entre SEQ ID NO: 7 y 9, y seleccionar 3 o 4 péptidos a los que los anticuerpos son positivos en el orden de medida del mayor al menor.

30 En otro aspecto más, el método de la presente invención comprende la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 8 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12 y 13 y seleccionar 3 o 4 péptidos a los que los anticuerpos son positivos en el orden de medida del mayor al menor.

35 También se describe en el presente documento que cuando se dirigen al cáncer de próstata, el método de la presente invención puede comprender la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 7 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, y 12 o SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, y 13, o contra 6 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, y 11, y seleccionar los péptidos a los que los anticuerpos son positivos.

40 Cuando se dirigen al tumor cerebral, el método de selección de la presente invención puede comprender la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 8 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 11, 12, 13, y 7. También se describe en el presente documento que cuando se dirigen a un tumor cerebral, el método de selección de la presente invención puede comprender la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 7 péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, 14, 6, 8, 11, 12 y 13, y seleccionar los péptidos a los cuales son positivos los anticuerpos.

45 En el método para seleccionar péptidos de acuerdo con la presente invención, se seleccionan 3 a 4 péptidos en el orden de medida obtenido midiendo los anticuerpos contra los péptidos, es decir, en el orden de reactividad del anticuerpo contra el péptido, de mayor a menor. La medición incluye, por ejemplo, la intensidad de fluorescencia (FIU) cuando se utiliza un marcador fluorescente, y mediciones por colorimetría (DO). Cuando se utiliza una sustancia de referencia para la cuantificación, la medición se tiene que convertir a cantidad de la sustancia de referencia.

50 Los péptidos que se seleccionan de esta manera para cada paciente se fabrican cada uno en forma de solución como se ha descrito anteriormente y se mezclan preferentemente con un adyuvante o similares para su administración. Ejemplos del adyuvante que se puede utilizar en la presente invención incluyen el adyuvante incompleto de Freund (por ejemplo, ISA-51 o similares, SEPPIC Corporation) o polisacáridos tales como pululano que es capaz de emulsionar una solución peptídica para aumentar la retención del péptido en el sitio de administración, y sustancias que tienen un efecto inmunoamplificador, tales como el adyuvante completo de Freund, BCG, alúmina, GM-CSF, IL-2, y CpG. El adyuvante incompleto de Freund es preferible entre otros.

60 Los péptidos preparados de esta manera normalmente se administran por vía subcutánea a un paciente. Esto es debido a que cuando, por ejemplo, se administran por inyección intravenosa o similares, los péptidos que comprenden la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se descomponen rápidamente y no pueden inducir suficientemente una respuesta inmunológica y debido a que los péptidos administrados por vía subcutánea pueden activar eficazmente los CTL que tienen actividad citotóxica ya que debajo de la piel hay células presentadoras de antígeno que capturan un antígeno, lo presentan en la superficie celular por medio de una

molécula HLA, y activan las células T tales como los CTL, y las células B.

El sitio de administración es preferentemente cualquiera lo más cerca de un posible ganglio linfático de una lesión cancerosa desde el momento del inicio de la administración; por ejemplo, en una región femoral para el cáncer de próstata y una región dorsal para un tumor cerebral. Puede ser otra región (tal como una región abdominal o braquial) cuando la inflamación o similares se produce en el sitio de administración debido a un efecto secundario a la administración, que hace difícil la administración.

La dosis de los péptidos no está limitada particularmente siempre que sea una dosis que sea aceptable para la administración subcutánea de la misma; sin embargo, es preferentemente de 1 mg o más, más preferentemente de 1 a 5 mg, aún más preferentemente de 3 a 5 mg por masa de polvo peptídico seco de un péptido. Se puede administrar una dosis de más de 5 mg.

La frecuencia de administración de los péptidos es una frecuencia a la que se obtiene una respuesta inmunológica; por ejemplo, es de una vez cada 7 a 21 días, más preferentemente una vez cada 7 a 14 días. La frecuencia de administración se puede cambiar durante el periodo de administración; se contempla por ejemplo, que dichos péptidos se administren a una vez cada 7 días del inicio a la 6ª ronda de administración, se administre a una frecuencia de una vez cada 14 días dependiendo del estado del paciente a la 7ª ronda y después, y se administre a un intervalo más largo (a una frecuencia de una vez cada 21 a 28 días) si se obtiene una suficiente respuesta inmunológica. A este respecto, "estado del paciente" significa la carga del paciente que se produce por la administración, tales como la inflamación y el dolor agudo en el sitio de administración.

El número de veces de administración de péptidos es al menos 6, preferentemente 12 o más, más preferentemente 18 o más. El límite superior del número de veces de administración no se limita particularmente siempre que el paciente pueda aguantar la administración; sin embargo, como los péptidos se han administrado hasta 84 veces en un ensayo clínico como se describe en los Ejemplos, es posible la administración de hasta 84 veces.

Los péptidos, por lo tanto, se pueden seleccionar y administrar a un paciente para activar los CTL contra los péptidos administrados para eliminar las células cancerosas para proporcionar un efecto clínico. Es posible que la selección y administración de péptidos no aumenten la reactividad de los anticuerpos contra los péptidos o puede que no activen los CTL contra los péptidos administrados. Por lo tanto, considerando un aumento de la reactividad de los anticuerpos, se recolecta de nuevo sangre periférica preferentemente cada al menos 6 veces de administración, más preferentemente de 6 a 12 veces de administración del paciente para medir la reactividad de los anticuerpos contra los respectivos péptidos que comprenden la composición para re-seleccionar péptidos que presenten una alta reactividad. Dicha re-selección permite que se seleccionen los péptidos óptimos que presentan una alta reactividad para cada paciente y hace posible que se obtenga una respuesta inmunológica más excelente.

El número de veces de re-selección de los péptidos no se limita particularmente; sin embargo, la re-selección se lleva a cabo preferentemente una vez o más, más preferentemente dos veces o más. La reacción de anticuerpos contra los péptidos administrados se obtenía suficientemente tras 24 veces de administración desde el inicio de la administración y el cambio de péptidos que se va a administrar no se puede llevar a cabo en el ensayo clínico como se describe en el Ejemplo, y por lo tanto, la re-selección se puede llevar a cabo 1 a 4 veces, preferentemente 2 a 4 veces cuando los péptidos se re-seleccionan cada 6 a 12 veces de administración.

La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se puede utilizar en combinación con otro agente antitumoral o estrategia terapéutica dependiendo de la especie de cáncer a tratar. Las células cancerosas de un paciente son una población heterogénea, como se ha descrito anteriormente, en la que están presentes células que es imposible eliminar completamente por una respuesta inmunológica y células resistentes a agentes antitumorales, terapia hormonal, o similar; por lo tanto, el uso combinado de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y otro agente antitumoral o estrategia terapéutica puede aumentar los efectos clínicos tal como la contracción de las lesiones cancerosas y la prolongación del tiempo de supervivencia. Ejemplos de otro agente antitumoral incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de polimerización de microtúbulos, y agentes moleculares dirigidos; ejemplos específicos de estos incluyen 5-FU, estramustina, docetaxel, temozolomida, cisplatino, Gemzar, y rituximab. Ejemplos de otra estrategia terapéutica incluye cirugía, radioterapia, terapia hormonal (un esteroide tal como dexametasona, mitoxantrona, prednisolona, estrógenos, o progesterona, o agentes análogos tales como Leuplin).

Cuando la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se utilizan en combinación con otro agente anti-tumoral o estrategia terapéutica, dicho otro agente anti-tumoral o estrategia terapéutica se utiliza preferentemente en el intervalo que no afecte la activación del sistema hematopoyética y una respuesta inmunológica debido a que la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas ejerce un efecto de activación de las células hematopoyéticas tales como los CTL. Por ejemplo, la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se pueden administrar tras la recuperación del recuento de linfocitos tras administrar un agente anti-tumoral (hasta 500/ml o más, preferentemente 1000/ml o más, por ejemplo); otro agente antitumoral o estrategia terapéutica se puede utilizar tras la administración de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas; u otro agente anti-tumoral o estrategia terapéutica se puede administrar

en un intervalo que no produzca una disminución del recuento de leucocitos y el recuento de linfocitos durante el periodo de administración de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

5 Por ejemplo, cuando la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se utiliza en combinación con estramustina, la dosis de estramustina durante el periodo de administración de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas será preferentemente de 180 a 280 mg/día debido a que la estramustina afecta al sistema hematopoyético. Cuando la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se utiliza en combinación con dexametasona, la dosis de dexametasona durante el periodo de administración de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas es preferentemente  
10 de 0,5 a 1 mg/día debido a que la dexametasona tiene el efecto de suprimir la respuesta inmunológica. Sin embargo, el Leuplin como análogo de LH-RH se puede administrar a la dosis habitual incluso cuando el Leuplin se administre durante el periodo de administración de la composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, debido a que afecta menos al sistema hematopoyético y el sistema inmunitario. De esa manera, dicho uso combinado se puede hacer durante el periodo de administración de la composición para su uso de acuerdo con las  
15 reivindicaciones adjuntas por el ajuste apropiado dependiendo del agente.

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle en referencia al Ejemplo. Sin embargo, la invención no tiene la intención de estar limitada al Ejemplo descrito.

## 20 **Ejemplo**

Se llevó a cabo un ensayo clínico para la indicación en cáncer prostático y tumor cerebral (glioblastoma) utilizando 14 péptidos antigénicos tumorales (SEQ ID NO: 1 a 14).

25 (Pacientes)

Los sujetos que entraron en este ensayo clínico eran 15 pacientes que eran positivos a HLA-A24 y que tienen un cáncer de próstata recurrente (HRPC) resistente a terapia hormonal y estramustina y 12 pacientes que tenían un glioblastoma progresivo (glioblastoma multiforme) que eran resistentes a la terapia inicial tal como cirugía y presentaban recurrencia. Las características del paciente tenían un estado de actuación de 0 o 1 y un recuento de linfocitos de 1.000/ml o más para los pacientes de cáncer de próstata y un estado de actuación de 0 a 3 y un recuento linfocitos de 500/ml o más para pacientes de glioblastoma.

35 (Agentes)

En el ensayo clínico, se utilizaron formulaciones que se obtenían disolviendo cada uno de los péptidos en polvo de SEQ ID NO: 1 a 14 (con una pureza de más del 95%) en solución salina o bicarbonato sódico y secadas por congelación, y con adyuvante incompleto de Freund (ISA-51VG, SEPPIC Corporation).

40 (Ensayo de selección de péptidos y ensayo de re-selección)

Un anticuerpo contra un péptido en la sangre periférica del paciente se midió utilizando una tecnología múltiple proporcionada por Luminex Corporation por un método descrito en la Patente japonesa N° 3960614 utilizando cada uno de los péptidos en polvo de SEQ ID NO: 1 a 14. Más específicamente, se puede preparar un vehículo en el que se inmovilice cada péptido en la superficie de microperlas (Luminex Corporation) tras disolver el péptido en polvo en DMSO. Posteriormente, se mezcló el plasma (sangre heparinizada) obtenida de la recolección de sangre del paciente con el vehículo inmovilizado para que reaccionara el anticuerpo contenido en el plasma con el péptido inmovilizado en el vehículo. Entonces, se recuperó el vehículo inmovilizado, tras la reacción; el anticuerpo de la sangre periférica del paciente, unido al péptido en el soporte se marcó de manera fluorescente utilizando un anticuerpo anti-humano biotinilado (Vector Corporation) y un colorante fluorescente avidinilado (Streptavidina-PE, Invitrogen Corporation), y se midió la intensidad fluorescente (FIU) del mismo.

Basándose en la FIU obtenida de esta manera, se seleccionaron 4 péptidos para cada paciente en orden de valor numérico descendente de FIU. Los anticuerpos contra los péptidos se midieron de nuevo utilizando el plasma obtenido administrando los respectivos péptidos 6 veces por curso al paciente y recolectando sangre tras el fin de cada curso y se re-seleccionaron los péptidos en orden descendente del valor de la FIU obtenida y se administraron al paciente.

60 (Administración de péptidos)

Los 4 péptidos seleccionados se fabricaron cada uno en forma de solución añadiendo agua para inyección, se emulsionaron mezclándolos con ISA-51VG y se administraron por vía subcutánea al paciente. Los pacientes se dividieron en un grupo de administración de 1 mg de cada péptido en un volumen con base de péptido (6 pacientes de HRPC y 6 pacientes de glioblastoma), un grupo de administración de 3 mg (6 pacientes de HRPC y 6 pacientes de glioblastoma), y un grupo de administración de 5 mg (3 pacientes de HRPC), y se llevó a cabo la administración, estableciendo 1 curso de 6 veces de administración.

La administración se llevó a cabo a una frecuencia de una vez cada 7 días desde el inicio de la administración hasta después del final de 1º curso y a una frecuencia de 7 días o 14 días a juicio del investigador clínico dependiendo del estado de inflamación en el sitio de administración en un paciente desde la 7ª administración y posteriores.

- 5 El sitio de administración era la región femoral para los pacientes de HRPC y una región dorsal para los pacientes de glioblastoma, y los péptidos seleccionados se administraron por vía subcutánea individualmente.

10 La administración de los péptidos se continuó mientras el paciente deseara continuar con la terapia y no se observara progresión de la enfermedad en el paciente, y se terminaba cuando el investigador clínico juzgaba que se observaba progresión de la enfermedad. Específicamente, para el cáncer prostático, el investigador clínico juzgaba que la enfermedad había progresado, por ejemplo, cuando observaba un aumento del PSA o una nueva metástasis. Para el tumor cerebral, el investigador clínico juzgaba que la enfermedad era progresiva, por ejemplo, cuando observaba un aumento de las lesiones en la determinación por formación de imágenes diagnósticas (una medición bidireccional o RECIST) o cuando se observaban metástasis.

15 Para los pacientes con HRPC, durante el periodo de administración de péptidos, se administraron 3,75 mg/mes de Leuplin o 3,6 mg/mes de goserelina para el mantenimiento de la condición infértil y se utilizaron en combinación con 280 mg/día de estramustina.

20 (Medición de la actividad de CTL)

25 Se separaron las PBMC de la sangre periférica obtenida por recolección de sangre al inicio de la administración y al final de cada curso para la liofilización, y se midió la actividad de CTL utilizando todas las PBMC por un método conocido (Hida N, Maeda Y, Katagiri K, Takasu H, Harada M, Itoh K., A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in circulation. Cancer Immunol Immunotherapy 2002; 51: 219-228) tras el final de la administración. Primero, se cultivaron las PBMC en presencia de cada péptido administrado durante 2 semanas, y se co-cultivaron las PBMC con células diana positivas a HLA-A24 que presentaban el péptido administrado por medio de las moléculas de HLA. Después, se midió la actividad de los CTL midiendo el IFN-γ secretado en el sobrenadante del cultivo por la reacción de los CTL de las PBMC con las células diana. El co-cultivo se llevó a cabo en 4 condiciones distintas para cada péptido; se obtuvieron 4 valores para cada péptido de cada PBMC obtenidas de cada recolección de sangre; y el total de los 4 valores se utilizaron como un valor (pg/ml) de IFN-γ para los análisis que se describen posteriormente.

35 (Evaluación del efecto clínico)

El efecto clínico se evaluó de la siguiente manera:

40 Para el HRPC, se observaba un tiempo de supervivencia desde la fecha del registro definitivo en el ensayo clínico mayor de 3 años, se calculó el valor de la mediana del tiempo de supervivencia (MST). Como resultado, como se muestra en la Tabla 1, la MST era de 23,8 meses en 15 casos (como los del 10 de marzo de 2010). Era de 29,4 meses en sujetos en los que se administraron 3 mg o más. De acuerdo con los informes con el uso de docetaxel como agente quimioterápico para la terapia del cáncer de próstata resistente a la terapia con hormonas (Bibliografía No Patente 36 y 37), la MST era de 17,5 meses para el uso combinado de docetaxel y estramustina y de 18,9 meses para el uso combinado de docetaxel y prednisolona; en vista de esto, se sugirió que la composición tenía el efecto de prolongar el tiempo de supervivencia.

[Tabla 1]

	Todos los grupos	Grupo de 1 mg	Grupo de 3 mg + grupo de 5 mg
MST	23,8	22,8	29,4
n	15	6	9

50 Por otra parte, para el tumor cerebral, se llevó a cabo un ensayo MRI cada 6 veces de administración para determinar el cambio de morfología del tumor. Para la medición bidireccional, el aumento o la contracción de la lesión se determinó por el producto del diámetro principal de una lesión medible y el diámetro máximo perpendicular del mismo, y por el RECIST, el aumento o contracción de la lesión se determinó por la suma de los diámetros más largos de hasta 6 lesiones medibles. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En la tabla, "PR" indica la presencia de una respuesta parcial (un 50% o menos de disminución en el producto o un 30% o menos de disminución en la suma) para cada uno de los métodos de medición bidireccional o el método RECIST, es decir, un efecto de contracción de las lesiones; "NC" indica la ausencia de aumento en las lesiones; y "PD" indica la presencia de progresión de la enfermedad tal como un aumento de la lesión.

[Tabla 2]

	PR	NC	PD
Todos los grupos	2	5	5
Grupo de administración de 1 mg	1	3	2
Grupo de administración de 3 mg	1	2	3

La composición daba como resultado 2 casos de PR y 5 casos de NC para el glioblastoma progresivo; por lo tanto, se consideraba que la composición podía suprimir la progresión de la enfermedad en el glioblastoma.

5 Los efectos secundarios en 15 pacientes de HRPC y 12 pacientes de glioblastoma eran solamente efectos secundarios leves; se podía confirmar también que la composición era excelente en seguridad.

(Análisis de la dosis y la respuesta inmunológica)

10 Para los pacientes de HRPC, la media de valores de IFN- $\gamma$  o FIU se calculó en el grupo de administración de 1 mg (nivel I), el grupo de administración de 3 mg (nivel II), y el grupo de administración de 5 mg (nivel III) para analizar la relación entre la dosis y la respuesta inmunológica. Los resultados para los valores de IFN- $\gamma$  se muestran en la Tabla 3 y la Figura 1, y los resultados para la FIU se muestran en la Tabla 4 y la Figura 2.

15

[Tabla 3]

Cáncer de Próstata /CTL	Grupo de 1 mg	Grupo de 3 mg	Grupo de 5 mg	Grupo de 3 mg + Grupo de 5 mg
pre	368	258	513	343
post	677	7.272*	3.815 *	6.087 *

\*: p < 0,05, respecto a los valores de pre-administración (pre)

[Tabla 4]

Cáncer de Próstata /Ab	Grupo de 1 mg	Grupo de 3 mg	Grupo de 5 mg	Grupo de 3 mg + Grupo de 5 mg
pre	387	147	221	171
post	11.172 *	14.012*	17.444*	15.125*

\*: p < 0,05, respecto a los valores de pre-administración (pre)

20 De manera similar, para los pacientes con glioblastoma, la media de los valores de IFN- $\gamma$  o la FIU se calculó en el grupo de administración de 1 mg (nivel I) y el grupo de administración de 3 mg (nivel II) para analizar la relación entre la dosis y la respuesta inmunológica. Los resultados para los valores de IFN- $\gamma$  se muestran en la Tabla 5 y la Figura 3, y los resultados de la FIU se muestran en la Tabla 6 y la Figura 4.

25

[Tabla 5]

Tumor cerebral/CTL	Grupo de 1 mg	Grupo de 3 mg
pre	124	98
post	2.594*	1.845*

\*: p < 0,05, respecto a los valores de pre-administración (pre)

[Tabla 6]

Tumor cerebral/Ab	Grupo de 1 mg	Grupo de 3 mg
pre	188	85
post	919*	1.201*

\*: p < 0,05, respecto a los valores de pre-administración (pre)

Para los pacientes de HRPC, los valores de IFN- $\gamma$  estaban significativamente aumentados tras la administración de 3 mg o más (el grupo de administración de 3 mg, el grupo de administración de 5 mg, o ambos de los mismos) en comparación con los de antes de la administración (Tabla 3). La FIU también aumentó significativamente tras la administración en comparación con los de antes de la administración en todos los grupos (Tabla 4). Por otra parte, para los pacientes de glioblastoma, se confirmaron aumentos significativos de los valores de IFN- $\gamma$  y la FIU por la administración de 1 mg o más (Tablas 5 y 6).

Estos resultados demostraban que la activación de CTL se obtenía por la administración de al menos 1 mg, preferentemente 3 mg o más, más preferentemente de 3 mg a 5 mg. Sin embargo, para la administración de 5 mg, había un paciente para el que fue posible la administración del mismo pero necesitaba llevarse a cabo a un intervalo más largo debido a la inflamación en el sitio de administración, por lo tanto, se consideraron la carga del paciente y la activación de CTL, la dosis de péptido se consideró que fuera preferentemente hasta 5 mg, más preferentemente de 3 a 5 mg.

(Análisis del número de veces de administración y respuesta inmunitaria)

Para los pacientes de HRPC, las medias de los valores de IFN- $\gamma$  y FIU obtenidos a partir del plasma o PBMC que se obtuvieron al final de cada curso, desde antes de la administración hasta el 6º curso, se calcularon en el grupo de administración de 1 mg y el grupo de administración de 3 mg o más para analizar la relación entre el número de veces de administración y la respuesta inmunológica. Los resultados para los valores de IFN- $\gamma$  se muestran en la Tabla 7 y la Figura 5, y los resultados para la FIU se muestran en la Tabla 8 y la Figura 6. El "número de veces de administración" en la tabla y la figura es el número total de veces de administración al final de cada curso, y el número de veces de administración por curso es de 6.

[Tabla 7]

Nº de veces de administración	0	6	12	18	24	30	36
Todos los grupos	353	1.651 *	1.065	3.912*	5.139*	6.097*	4.586*
Grupo de 1 mg	368	908	284	469	1.209	524	640
Grupo de $\geq$ 3 mg	343	2.146 <sup>#</sup>	1.846 <sup>#</sup>	6.207*	8.283*	11.670*	8.532*

\*:  $p < 0,05$ , respecto a los valores para el número de veces de administración de "0"

<sup>#</sup>:  $p < 0,1$ , respecto a los valores del número de veces de administración de "0"

[Tabla 8]

Nº de veces de administración	0	6	12	18	24	30	36
Todos los grupos	271	1.542 *	10.665*	17.125*	18.760*	18.515*	21.606*
Grupo de 1 mg	387	652	4.349*	9.497*	12.702*	12.358*	16.966*
Grupo de $\geq$ 3 mg	171	2.311*	15.297*	22.764*	23.035*	22.992 *	24.137 *

\*:  $p < 0,05$ , respecto a los valores para el número de veces de administración de "0"

De manera similar, para los pacientes de glioblastoma, se calcularon las medias de los valores de IFN- $\gamma$  y FIU obtenidos del plasma o PBMC obtenidas al final de cada curso desde antes de la administración hasta el 2º curso en el grupo de administración de 1 mg (nivel I) y el grupo de administración de 3 mg o más (nivel II) para analizar la relación entre el número de veces de administración y la respuesta inmunológica. Los resultados para los valores de IFN- $\gamma$  se muestran en la Tabla 9 y la Figura 7, y los resultados de la FIU se muestran en la Tabla 10 y la Figura 8. El "número de veces de administración" en la tabla y la figura es el número total de veces de administración al final de cada curso, y el número de veces de administración por curso es de 6.

[Tabla 9]

Nº de veces de administración	0	6	12
Todos los grupos	111	1.483*	2.632*
Grupo de 1 mg	124	1.060 <sup>#</sup>	2.679*
Grupo de $\geq$ 3 mg	98	1.906*	2.586 <sup>#</sup>

\*:  $p < 0,05$ , respecto a los valores para el número de veces de administración de "0"

<sup>#</sup>:  $p < 0,1$ , respecto a los valores del número de veces de administración de "0"

[Tabla 10]

Nº de veces de administración	0	6	12
Todos los grupos	136	181	715*
Grupo de 1 mg	188	247	1.462*
Grupo de ≥ 3 mg	85	118	181#
*: p < 0,05, respecto a los valores para el número de veces de administración de "0" #: p < 0,1, respecto a los valores del número de veces de administración de "0"			

5 Para los pacientes de HRPC, se observó que los CTL estaban aumentados significativamente tras 18 veces de administración en el grupo de administración de 3 mg o más (Tabla 7). Se observó un aumento significativo de anticuerpos tras 6 veces de administración en todos los grupos y tras 12 veces de administración en el grupo de administración de 1 mg (Tabla 8). Esto demostraba que se podían activar los CTL administrando 3 mg o más de cada péptidos 18 veces.

10 Para los pacientes de glioblastoma, se podía confirmar que los CTL estaban significativamente aumentados desde después de las 6 veces de administración (Tabla 9), y se confirmó un aumento significativo de anticuerpos desde después de las 12 veces de administración (Tabla 10).

15 Los resultados anteriores demostraban que el número de veces de administración del péptido era al menos de 6 o más, preferentemente de 12 o más y, para el cáncer de próstata, más preferentemente de 18 o más. El límite superior del número de veces de administración no está particularmente limitado, y la administración es posible siempre que el paciente desee la administración, sin embargo, la administración se puede llevar a cabo hasta 79 veces ya que la administración se llevó a cabo hasta 54 veces en los pacientes de cáncer de próstata y hasta 79 veces en pacientes de glioblastoma en este ensayo.

20 Además, se demostró que el valor de anticuerpos alcanzaba una meseta sustancialmente tras 12 veces de administración (Figura 3). Por lo tanto, con respecto a la frecuencia que confirmaba respuestas inmunológicas contra los péptidos administrados y la re-selección de péptidos, también se demostraba que se podían seleccionar los péptidos óptimos para cada paciente examinando un anticuerpo para cada péptido cada 6 veces de administración, preferentemente 6 a 12 meses de administración.

25 (Análisis de correlación entre anticuerpos y CTL)

30 Debido a que la actividad de CTL y reactividad de anticuerpos presentaban un aumento dependiendo de la dosis y el número de veces de administración de los péptidos, se analizó si había una correlación o no entre el aumento de actividad de CTL y el aumento de actividad de anticuerpos. Se llevó a cabo el análisis en pacientes de HRPC en los que el número de veces de administración era el mayor.

35 Para la activación de los CTL, se calcularon los valores que se obtenían restando un valor de IFN-γ antes de la administración del péptido de los valores de IFN-γ obtenidos a partir de las PBMC en los puntos de recolección de sangre respectivos, y se calculó el valor medio (valor Δ) de los valores resultantes para cada paciente. Por otra parte, para los anticuerpos, debido a que el valor de la FIU al inicio de la administración era extremadamente pequeña en comparación con la de después de la administración, los valores medios de la FIU se analizaron entre los valores medios de los valores Δ y la FIU obtenida de cada paciente. Los coeficientes de correlación resultantes se muestran en la Tabla 11.

40

[Tabla 11]

	Todos los grupos	1 mg	3 mg	5 mg	3 mg y 5 mg
r	0,65	-0,40	0,96	0,61	0,69
n	15	6	6	3	9
p	0,01	0,43	0,00	0,58	0,04

45 Se obtuvo una correlación significativa en el grupo de administración de 3 mg, el grupo en el que el grupo de administración de 3 mg se combinaba con el grupo de administración de 5 mg (el grupo de administración de 3 mg o más), y todos los grupos, en los que se observaba que los CTL estaban significativamente aumentados.

Los resultados de la Tablas 7 a 11 indicaban que en el grupo de administración de 3 mg o más en el que se obtenía una respuesta significativa de CTL, (1) se encontraba una reactividad de anticuerpos significativamente aumentada

desde las 6 veces de administración; (2) se encontraba que la actividad de los CTL tenía una tendencia al aumento desde después de las 6 veces de administración y aumentaba significativamente desde después de las 18 veces de administración en un momento posterior a la reactividad de anticuerpos; y (3) el aumento de la reactividad de anticuerpos se correlacionaba con el aumento de la actividad de CTL.

En otras palabras, basándose en las mediciones de los anticuerpos que presentan reacción a los péptidos respectivos, los péptidos se podían re-seleccionar y administrarlos para aumentar eficazmente los CTL contra los péptidos administrados; se consideraba que los péptidos óptimos para cada paciente se podían seleccionar y administrar por dicho método de selección.

Para los pacientes de HRPC, la reacción de CTL por los péptidos seleccionados en la selección inicial y la reacción de los CTL por los péptidos re-seleccionados y administrados, se analizó utilizando los valores de IFN- $\gamma$  en 7 casos en los que se llevó a cabo la re-selección de péptidos, entre el grupo de administración de 3 mg y el grupo de administración de 5 mg en los que se observaban aumentos significativos de los CTL. Los resultados se muestran en la Tabla 12 y la Figura 9. Como la re-selección inicial de péptidos se llevó a cabo al final del 1º curso, se muestran en la tabla y la figura las medias de las mediciones después de la re-selección (valores medidos al final del 2º curso o posteriores). El "número de veces de administración" en la tabla y la figura es el número total de veces de administración al final de cada curso, y el número de veces de administración por curso es de 6.

[Tabla 12]

Número de veces de administración	12	18	24	30	36
Péptidos seleccionados inicialmente	1.736	5.163	3.982	5.291	4.604
Péptidos re-seleccionados	27	1.044	4.301	6.379	3.928

La Tabla 12 muestra que la proporción de activación de CTL por los péptidos re-seleccionados en la activación total de CTL era mayor tras las 24 veces de administración, lo que corresponde con las 18 veces de administración para los péptidos administrados por re-selección tras 6 veces de administración. Esto demostraba que la activación de CTL contra los péptidos seleccionados por la re-selección de péptidos contribuía significativamente a la activación total de CTL en cada paciente. El número de pacientes en los que se llevó a cabo la re-selección era 6 de 7 tras las 6 veces de administración, 3 de 6 tras las 12 veces de administración, 2 de 5 tras las 18 veces de administración, y 0 tras las 24 veces de administración.

(Análisis de la respuesta inmunológica y tiempo de supervivencia)

Además, para los pacientes de HRPC, se calcularon los promedios de los valores  $\Delta$  y FIU obtenidos para cada paciente, y se analizó su correlación con el tiempo de supervivencia. Los resultados de los coeficientes de correlación que se obtuvieron se muestran en la Tabla 13 para los valores  $\Delta$  y en la Tabla 14 para la FIU.

[Tabla 13]

	Todos los grupos	1 mg	3 mg	5 mg	3 mg y 5 mg
r	0,29	-0,69	0,92	0,51	0,53
n	15	6	6	3	9
p	0,29	0,13	0,01	0,66	0,14

[Tabla 14]

	Todos los grupos	1 mg	3 mg	5 mg	3 mg y 5 mg
r	0,24	-0,32	0,89	0,99	0,61
n	15	6	6	3	9
p	0,39	0,54	0,02	0,07	0,08

Tanto para los valores  $\Delta$  como para la FIU, el aumento de la activación de CTL o de anticuerpos tiende a correlacionarse con el tiempo de supervivencia en el grupo de administración de 3 mg o más, particularmente, se obtuvo una fuerte correlación en el grupo de administración de 3 mg. A partir de esos resultados, se considera que la administración de al menos 3 mg o más, preferentemente 3 a 5 mg de cada péptido aumentaba la reactividad y la actividad de los CTL, lo que contribuye al tiempo de supervivencia.

(Análisis del péptido administrado)

5 En 15 pacientes de HRPC (402 veces de administración en total) y 12 pacientes de glioblastoma (198 veces de administración en total), se calcularon la frecuencia de uso de cada péptido, el número de pacientes que recibieron la administración, cada valor medio de las mediciones de un anticuerpo (FIU) y los valores de IFN- $\gamma$  para los CTL tras la administración de péptidos, y el número medio de veces de administración. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

[Tabla 15]

Péptido	Cáncer de próstata										Tumor cerebral								
	Frecuencia de uso			Ab	CTL(IFN)		Número medio de veces de administración		1 FN post promedio/nº medio de veces de administración		Frecuencia de uso		Ab	CTL(IFN)		Número medio de veces de administración		1 FN post promedio/nº medio de veces de administración	
	Ensayo clínico		Tasa de uso	Post promedio	Post promedio	Post promedio	Nº de pacientes	Nº de pacientes	Tasa de uso	Nº de pacientes	Tasa de uso	Nº de pacientes	Post promedio	Post promedio	Post promedio	Nº de pacientes	Nº de pacientes	Tasa de uso	Nº de pacientes
	Tasa de uso	Nº de pacientes																	
GP-101	4%	1	16.481	129	18,0	7	0%	0	0%	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
GP-102	0%	0	-	-	-	-	0%	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GP-103	3%	1	22	100	12,0	8	0%	0	0%	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
GP-104	96%	15	11.538	3.629	25,2	144	97%	12	97%	12	144	920	2.986	16,0	187	16,0	187	187	187
GP-105	70%	12	13.086	5.274	23,0	229	55%	8	55%	8	229	3.969	2.706	15,0	180	15,0	180	180	180
GP-106	13%	2	20.080	22.699	27,0	841	24%	3	24%	3	841	297	3.134	18,0	174	18,0	174	174	174
GP-107	40%	12	2.888	370	13,5	27	73%	8	73%	8	27	302	151	18,0	8	18,0	8	8	8
GP-108	72%	9	19.039	2.209	30,7	72	0%	0	0%	0	72	-	-	-	-	-	-	-	-
GP-109	30%	5	11.672	494	22,8	22	0%	0	0%	0	22	-	-	-	-	-	-	-	-
GP-110	3%	2	310	2.190	6,0	365	0%	0	0%	0	365	-	-	-	-	-	-	-	-
GP-111	21%	4	11.125	5.576	27,0	207	15%	4	15%	4	207	241	3.001	7,5	400	7,5	400	400	400
GP-112	6%	4	53	459	6,0	76	55%	8	55%	8	76	1.338	1.308	14,3	92	14,3	92	92	92
GP-113	10%	4	207	600	9,0	67	36%	5	36%	5	67	87	5.139	14,4	357	14,4	357	357	357
GP-114	31%	11	10.557	4.592	8,4	547	45%	9	45%	9	547	297	821	10,0	82	10,0	82	82	82

Entre SEQ ID NO: 1 a 14, no se seleccionó SEQ ID NO: 2 en la selección peptídica; por lo tanto, se demuestra que los péptidos se pueden seleccionar de entre un grupo de 13 péptidos de SEQ ID NO: 1 y 3 a 14. Particularmente, se demuestra que SEQ ID NO: 4, 5, y 14 eran favorables en cuanto a frecuencia de uso, número de pacientes que recibían la administración y valores de anticuerpos y CTL tanto del cáncer de próstata como el tumor cerebral y SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13 eran favorables en cuanto a frecuencia de uso, número de pacientes que recibían la administración y valor de los anticuerpos o CTL para el cáncer de próstata o para el tumor cerebral.

Por otra parte, los SEQ ID NO: 1, 3, y 10 eran bajos en cuanto a frecuencia de uso tanto para el cáncer de próstata como para el tumor cerebral; entre estos, SEQ ID NO: 3 se administró 12 veces a 1 paciente de HRPC pero no aumentaba la reactividad de anticuerpos y CTL y se cambió por otro péptido más tarde basándose en el ensayo de re-selección de péptidos. Por otro lado, el SEQ ID NO: 1 se utilizó en un paciente de HRPC pero era menor en la reactividad de CTL que otros péptidos. Además, el SEQ ID NO: 10 aumentaba el valor de CTL; sin embargo, no se administró continuamente aunque se midió un valor alto de estos en 1 de 2 casos.

Particularmente, el SEQ ID NO: 3 no aumentaba los anticuerpos y CTL en comparación con los SEQ ID NO: 1 y 10 que tenían una frecuencia de uso comparable a este; por lo tanto, el método de administración de los péptidos por selección utilizando anticuerpo se consideró que proporcionaba un efecto clínico suficiente cuando los péptidos se seleccionaban de un grupo de 12 péptidos, excluyendo los SEQ ID NO: 2 y 3. Se consideraba que podía esperarse que la exclusión del SEQ ID NO: 3 resultara en un efecto clínico más excelente debido a que se puede seleccionar y administrar otro péptido que fuera más esperable que activara los CTL y aumentara los anticuerpos.

En otras palabras, considerando que la administración continua de péptidos activaba los CTL y ejercía un efecto de prolongación de la vida, se consideró que 12 péptidos excluyendo el SEQ ID NO: 3 de los 13 péptidos de SEQ ID NO: 1 y 3 a 14, 11 péptidos, excluyendo adicionalmente el SEQ ID NO: 1 o 10, o 10 péptidos, excluyendo SEQ ID NO: 1, 3 y 10 de los 13 péptidos, se podía esperar que hubiera un efecto de prolongación de la vida suficiente. Además, la exclusión de estos péptidos daba como resultado la administración de péptidos de los que se esperaba más que activaran los CTL y aumentasen los anticuerpos; por lo tanto, considerando que la activación de CTL y el aumento de anticuerpos se correlaciona con el efecto de prolongación de la vida, se puede esperar un efecto clínico más excelente administrando otros péptidos de los que se espera más que activen CTL y aumenten los anticuerpos.

Para los 10 péptidos de SEQ ID NO: 4 a 9 y 11 a 14, se calculó el valor de IFN- $\gamma$  por administración, a partir del número medio de veces de administración del mismo y los valores de IFN- $\gamma$  cuando se fijaba 1 curso en 6 veces de administración de la Tabla 14; como resultado, se consideraba que los SEQ ID NO: 7 y 9 aumentaban poco la actividad de CTL y eran débiles en el efecto de prolongar la supervivencia por la activación de CTL en comparación con otros péptidos. Por lo tanto, incluso 9 péptidos, excluyendo SEQ ID NO: 7 o 9 de los 10 péptidos, u 8 péptidos, excluyendo ambos se consideraba que proporcionaban un efecto de prolongación de la vida. Además, el SEQ ID NO: 7, se administró a 12 sujetos y el SEQ ID NO: 9 a 5 sujetos; 1 de los 4 péptidos administrados en cada curso era el de SEQ ID NO: 7 o 9 en todos los pacientes. Por lo tanto, considerando que la actividad de CTL contra estos péptidos no estaba suficientemente aumentada, se consideró que el número a administrarse podía ser de al menos 3.

Además, entre los 8 péptidos de SEQ ID NO: 4 a 6, 8, y 11 a 14, SEQ ID NO: 12 y 13 tenían valores de activación de CTL bajos y son bajos en el promedio de número de veces de administración en comparación con otros péptidos para los pacientes de HRPC; por lo tanto, se considera que se podrían excluir basándose en la misma razón que se ha descrito anteriormente. En otras palabras, se consideró que cuando se pretenden para el cáncer de próstata, se podría esperar que los 6 péptidos de SEQ ID NO: 4 a 6, 8, 11, y 14 tengan un efecto de prolongación de la vida suficiente. De manera similar, debido a que el SEQ ID NO: 8 no se utilizó en pacientes de glioblastoma, se consideró que cuando se pretende para un tumor cerebral, se podría esperar que los 7 péptidos de SEQ ID NO: 4 a 6 y 11 a 14 tengan un efecto de prolongación de la vida.

Para verificar estos, se utilizaron los pacientes de HRPC como sujetos para analizar la correlación entre la medición de CTL obtenidos de cada uno de los grupos de 6 a 13 péptidos que se muestran en la Tabla 15 y el tiempo de supervivencia. Los coeficientes de correlación (R) que se obtienen mediante el análisis se muestran en la Tabla 16. En la tabla, el "porcentaje de concordancia de 3 péptidos" indica el porcentaje de pacientes que han recibido continuamente cualquiera de los 3 péptidos administrados a través de todos los cursos en los 15 pacientes, y la "tasa de positivos a anticuerpos" indica el porcentaje de pacientes que eran positivos a anticuerpos contra los 3 péptidos o más en el ensayo de anticuerpos en los 15 pacientes.

[Tabla 16]

Nº	Número de péptidos	Péptido Nº		Todos los grupos (n=15)	3 mg (n=6)	3 mg y 5 mg (n=9)	Porcentaje de concordancia de 3 péptidos (%)	Tasa de positivos a anticuerpos (%)	MST
1	6	4,5,14	6,8,11	0,29	0,90	0,56	60%	100%	22,08
2	7	4,5,14	6,8,11,12	0,29	0,92	0,56	67%	100%	22,92
3	7	4,5,14	6,8,11,13	0,29	0,90	0,57	73%	100%	23,75
4	8	4,5,14	6,8,11,12,13	0,30	0,92	0,57	80%	100%	26,60
5	9	4,5,14	6,7,8,11,12,13	0,31	0,94	0,56	87%	100%	23,75
6	9	4,5,14	6,8,9,11,12,13	0,32	0,91	0,57	87%	100%	23,75
7	10	4,5,14	6,7,8,9,11,12,13	0,32	0,93	0,57	100%	100%	23,75
8	11	4,5,14	1,6,7,8,9,11,12,13	0,33	0,93	0,57	100%	100%	23,75
9	11	4,5,14	6,7,8,9,10,11,12,13	0,32	0,93	0,56	100%	100%	23,75
10	12	4,5,14	1,6,7,8,9,10,11,12,13	0,32	0,93	0,56	100%	100%	23,75
11	13	4,5,14	1,3,6,7,8,9,10,11,12,13	0,32	0,93	0,57	100%	100%	23,75

La tabla 16 demostraba que la correlación entre el valor de CTL y el tiempo de supervivencia no se afectaba significativamente incluso para el grupo de 6 péptidos. También se demostraba que 3 péptidos o más podían administrarse continuamente a lo largo de todos los cursos en el 100% de los pacientes (15 de 15 pacientes) para los grupos de 10 a 13 péptidos, el 80% (12 de 15 pacientes) para el grupo de 8 péptidos, y aproximadamente el 60% para el grupo de 6 péptidos. El MST de los sujetos tenía valores comparables o mayores para los grupos de 8 péptidos N° 3 a 11 pero tendían a estar ligeramente disminuidos para los grupos n° 1 y 2. A partir de estos resultados, se consideró que se obtenía un efecto equivalente en la mayoría de los sujetos utilizando preferentemente un grupo de 7 péptidos o más.

- 5
- 10 De manera similar, el porcentaje de concordancia de 3 péptidos y la tasa de positivos a anticuerpos se analizó en 12 pacientes de glioblastoma. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

[Tabla 17]

Nº	Número de péptidos	Péptido N°		Porcentaje de concordancia de 3 péptidos (%)	Tasa de positivos a anticuerpos (%)
1	7	4,5,14	6,11,12,13	100%	100%
2	8	4,5,14	6,7,11,12,13	100%	100%
3	8	4,5,14	6,8,11,12,13	100%	100%
4	9	4,5,14	6,7,8,11,12,13	100%	100%
5	9	4,5,14	6,8,9,11,12,13	100%	100%
6	10	4,5,14	6,7,8,9,11,12,13	100%	100%
7	11	4,5,14	1,6,7,8,9,11,12,13	100%	100%
8	11	4,5,14	6,7,8,9,10,11,12,13	100%	100%
9	12	4,5,14	1,6,7,8,9,10,11,12,13	100%	100%
10	13	4,5,14	1,3,6,7,8,9,10,11,12,13	100%	100%

- 15 Como se muestra en la Tabla 17, el porcentaje de concordancia era del 100% (12 de 12 pacientes) en los pacientes de glioblastoma incluso para el grupo de 7 péptidos.

Además, se analizó si las diferencias en el número de veces de administración y la dosis afectaba al efecto clínico se analizó dividiendo 15 pacientes de HRPC en grupos. Se llevaron a cabo dos tipos de análisis: 1) calcular el MST por la división en 2 grupos de pacientes, los que recibieron 3 mg o más y la administración 12 veces o más y los otros pacientes, y 2) calcular el MST por división en dos grupos de pacientes, los que recibieron de 3 mg o más y la administración 18 veces o más y los otros pacientes. Los resultados se muestran en las Tablas 18 y 19.

- 20

[Tabla 18]

	Todos los grupos	Administración de 1 mg o menos de 12 veces de administración	3 mg o más y administración de 12 veces o más
MST	23,8	22,9	32,6
n	15	8	7

25

[Tabla 19]

	Todos los grupos	Administración de 1 mg o menos de 18 veces de administración	3 mg o más y administración de 18 veces o más
MST	23,8	21,9	32,8
n	15	9	6

Las Tablas 18 y 19 demostraban que los grupos de pacientes que recibían 12 veces de administración o 18 veces de administración en los que se podían confirmar aumentos de CTL y anticuerpos tendían a tener una MST larga en comparación con los otros grupos.

30

### Aplicabilidad industrial

La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas es una composición que comprende un grupo de péptidos derivados de antígenos tumorales y una composición para su uso en inmunoterapia que se

35

espera que sea una cuarta estrategia terapéutica tras la cirugía, quimioterapia y radioterapia. La composición hace posible la administración de péptidos apropiados para cada paciente, y es útil debido a que tiene un efecto clínico de supresión de la progresión de cánceres difíciles de tratar, tales como el cáncer de próstata y el tumor cerebral. La composición también se puede utilizar en combinación con otra estrategia terapéutica.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Green Peptide Co., Ltd.

10 <120> Vacuna peptídica contra el cáncer

<130> 670383

15 <150> JP 2010-154921

<151> 07-07-2010

<160> 14

20 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> EGF-R-800

<400> 1

30

**Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile**  
**1 5 10**

<210> 2

<211> 9

35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> EZH2-735

40

<400> 2

**Lys Tyr Val Gly Ile Glu Arg Glu Met**  
**1 5**

45

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> Lck-208

<400> 3

**His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu**  
**1 5**

55

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

60

<213> Artificial

ES 2 620 277 T3

<220>  
<223> Lck-486

5 <400> 4

**Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu**  
**1 5**

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

<220>  
<223> Lck-488

15 <400> 5

**Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe**  
**1 5 10**

20 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> MRP3-503

<400> 6

**Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu**  
**1 5**

30 <210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> MRP3-1293

40 <400> 7

**Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly Leu**  
**1 5 10**

45 <210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
50 <223> PAP-213

<400> 8

**Leu Tyr Cys Glu Ser Val His Asn Phe**  
**1 5**

55 <210> 9

ES 2 620 277 T3

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

5 <220>  
<223> PSA-248  
  
<400> 9

**His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile**  
**1 5 10**

10

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

15 <220>  
<223> PSMA-624  
  
<400> 10

20

**Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu**  
**1 5**

25 <210> 11  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> PTH-rP-102  
  
<400> 11

35

**Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val**  
**1 5 10**

40 <210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> SART2-93  
  
<400> 12

50

**Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile**  
**1 5**

55 <210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> SART2-161  
  
<400> 13

ES 2 620 277 T3

Ala Tyr Asp Phe Leu Tyr Asn Tyr Leu  
1 5

5 <210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> SART3-109  
<400> 14

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende de 8 a 13 péptidos de a) a d) a continuación:
- 5
- a) los péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, y 14;
  - b) 5 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13;
  - c) 0 a 2 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 7 y 9; y
  - d) 0 a 3 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10,
- 10
- donde la composición se va a utilizar de manera que los anticuerpos contra los péptidos respectivos en la sangre periférica de un paciente se van a medir y se van a seleccionar 3 o 4 péptidos contra los cuales son positivos los anticuerpos en el orden de medida de mayor a menor y se administran al paciente.
- 15
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición comprende 8 a 10 péptidos, y donde el número de los péptidos de cada uno de d) es 0.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición comprende 8 péptidos, y donde el número de los péptidos de cada uno de c) y d) es 0.
- 20
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral.
- 25
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la composición se va a utilizar de manera que los péptidos se van a administrar en una cantidad de 3 a 5 mg de cada péptido.
- 30
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición se va a utilizar de manera que los péptidos se van a administrar al menos 18 veces o más.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición se va a utilizar de manera que los péptidos se van a administrar de 6 a 12 veces, seguido por re-selección.
- 35
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende 12 péptidos de SEQ ID NO: 1 y 4 a 14.
- 40
10. Un método para seleccionar péptidos que se van a administrar para el tratamiento del cáncer, que comprende la medición de anticuerpos en la sangre periférica de un paciente contra 8 a 13 péptidos de a) a d) a continuación:
- a) los péptidos de SEQ ID NO: 4, 5, y 14;
  - b) 5 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 6, 8, 11, 12, y 13;
  - c) 0 a 2 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 7 y 9; y
  - d) 0 a 3 péptidos seleccionados de entre SEQ ID NO: 1, 3, y 10,
- 45
- y seleccionar 3 o 4 péptidos a los cuales los anticuerpos son positivos, en el orden de medida de mayor a menor.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende la medición de anticuerpos en sangre periférica de un paciente contra 12 péptidos de SEQ ID NO: 1 y 4 a 14.
- 50

Fig. 1

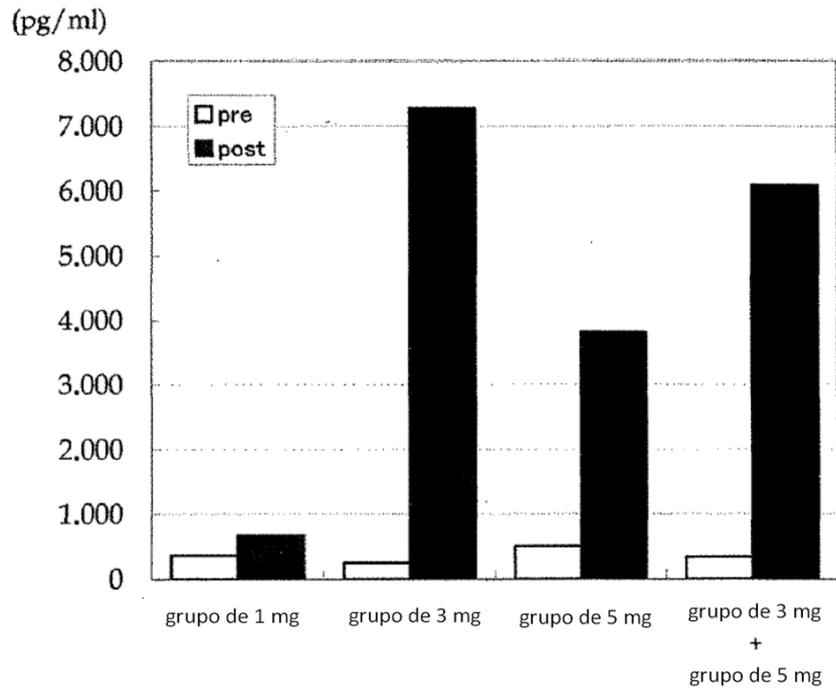


Fig. 2

(FIU)

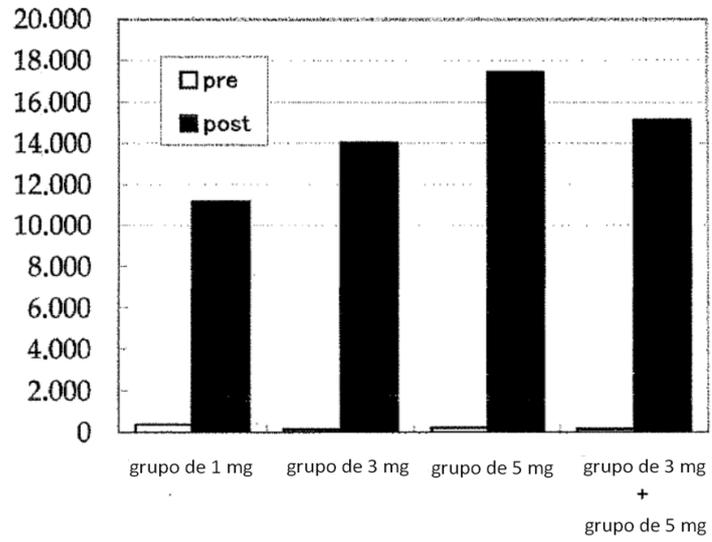


Fig. 3

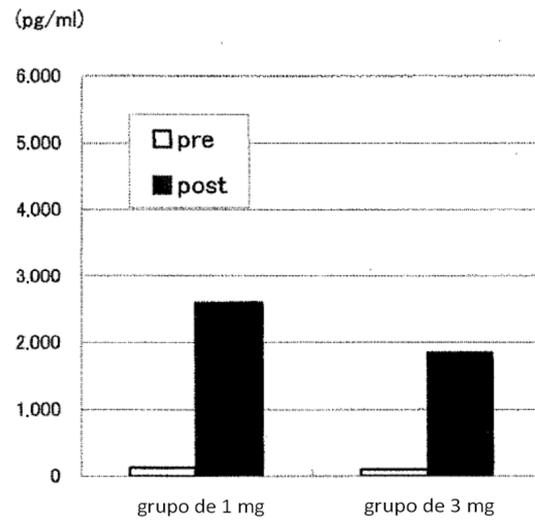


Fig. 4

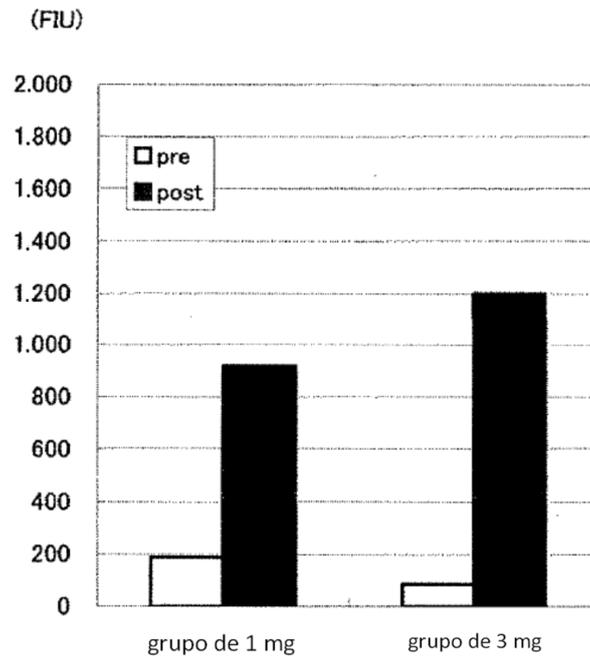


Fig. 5

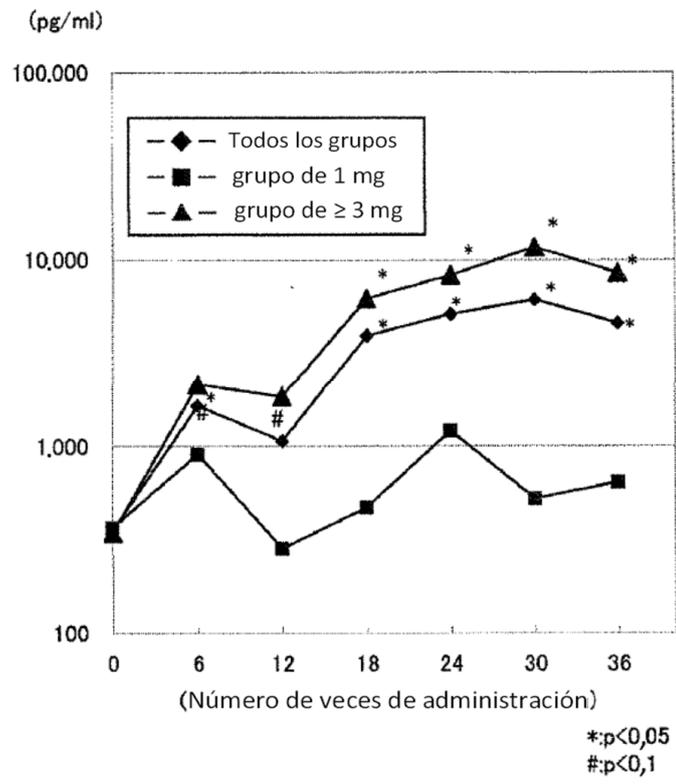
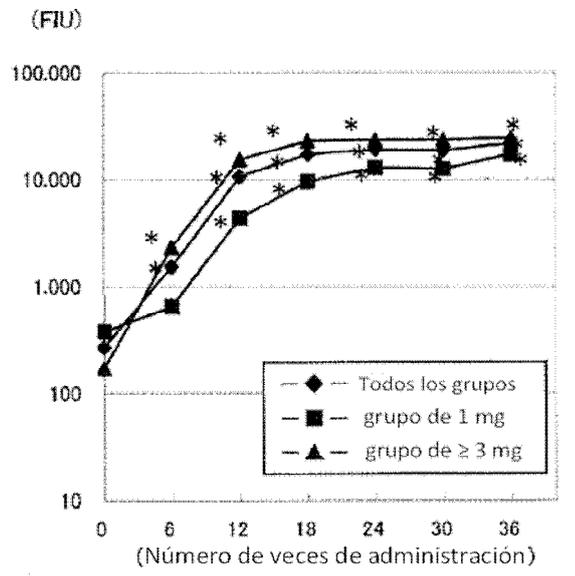


Fig. 6



\*:p<0,05

Fig. 7

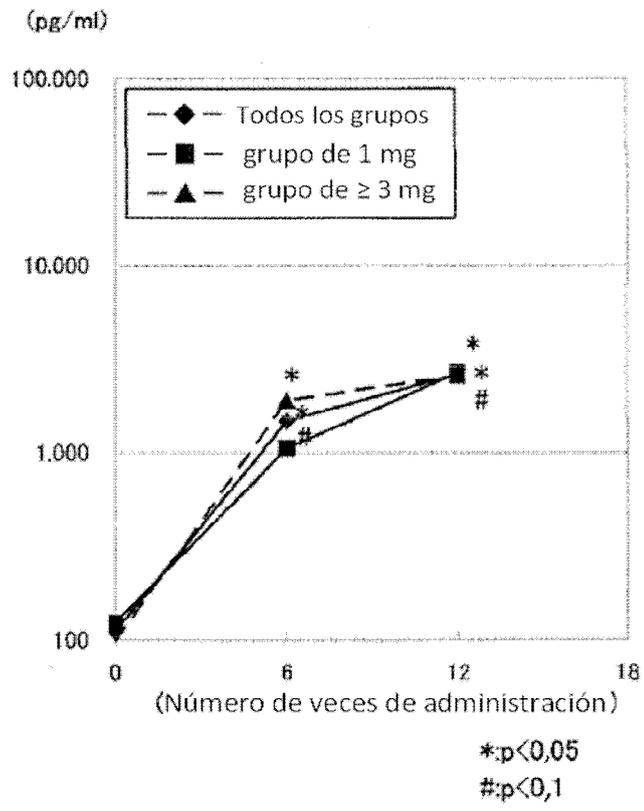


Fig. 8

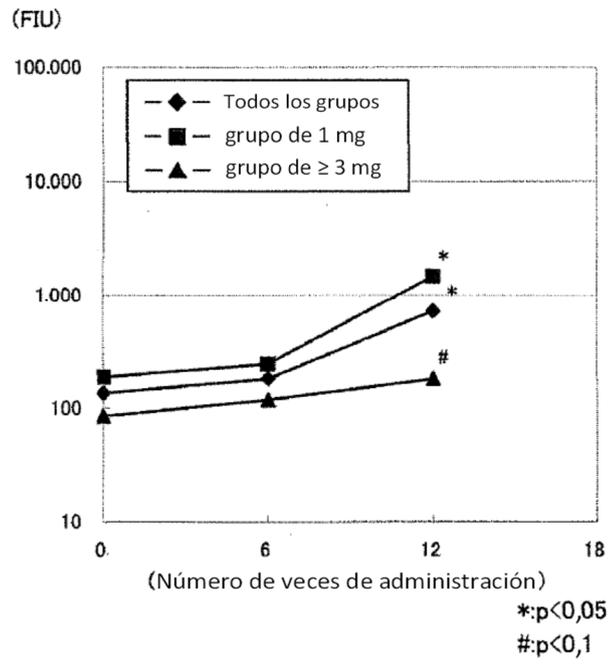


Fig. 9

