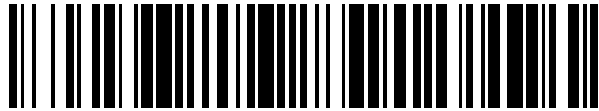


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 091**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/JP2014/059336**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14157692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14775899 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2982681**

54 Título: **Vacuna conjugada de péptido antigénico de WT1**

30 Prioridad:

29.03.2013 JP 2013072173

31.07.2013 JP 2013158383

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

23.11.2018

73 Titular/es:

**SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.
(50.0%)**

**6-8, Dosho-machi 2-chome
Chuo-ku Osaka-shi Osaka 541-8524, JP y
INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, CHIANG JIA;
BAN, HITOSHI;
NISHIO, YUKIHIRO;
GOTO, MASASHI;
NISHIHARA, TOSHIO y
TAKANASHI, YOSUKE**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 691 091 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 conjugada de péptido antigénico de WT15 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia del cáncer y se refiere a una vacuna conjugada que puede ser sometida a recorte por la peptidasa ERAP1, se obtiene conjugando precursores peptídicos derivados de la proteína antigénica WT1 a través de un enlace covalente azufre-azufre e induce eficazmente células T citotóxicas.

10

Técnica anterior

Para la erradicación de las células cancerosas en el organismo, la inmunidad celular, concretamente las células T citotóxicas (linfocitos T citotóxicos, células T citotóxicas, de aquí en adelante denominados CTL) juegan principalmente un papel importante. Los CTL se producen por diferenciación y proliferación de células T precursoras que reconocen un complejo formado por un péptido antigénico derivado de una proteína antigénica cancerosa (péptido antigénico canceroso) y una molécula del MHC de clase I, y atacan las células cancerosas.

15

Un gen supresor del cáncer de tumor de Wilms, WT1 (gen WT1) se considera una nueva proteína antigénica cancerosa contra la leucemia y los tumores sólidos (véase el documento no relacionado con patentes 1).

20

En cuanto a la proteína WT1, por ejemplo, se han notificado los siguientes péptidos antigénicos cancerosos que están unidos a y son presentados por el MHC de clase I (véanse los documentos relacionados con patentes 1, 2).

25

péptido WT1₁₂₆₋₁₃₄: RMFPNAPYL (Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu) (SEQ ID NO: 2),
 péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃: CMTWNQMNL (Cys-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu) (SEQ ID NO: 3), 7
 péptido WT1₁₁₀₋₁₁₈: ALLPAVPSL (Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Pro-Ser-Leu) (SEQ ID NO: 5),
 péptido WT1₁₈₇₋₁₉₅: SLGEQQYSV (Ser-Leu-Gly-Glu-Gln-Gln-Tyr-Ser-Val) (SEQ ID NO: 6),
 péptido WT1₃₀₂₋₃₁₀: RVPGVAPTL (Arg-Val-Pro-Gly-Val-Ala-Pro-Thr-Leu) (SEQ ID NO: 7) y similares.

En la inmunoterapia del cáncer, la activación de las células T auxiliares también es importante para activar otras células T, incluidos los CTL. En general, una proteína antigénica es degradada por el lisosoma intracelular, una parte de los fragmentos peptídicos constituidos por un péptido que consiste en aproximadamente 13 - 17 residuos de aminoácido, se une como un péptido antigénico a la molécula del MHC de clase II y se presenta al complejo de células T auxiliares - TCR·CD3 para activar la célula T auxiliar. En cuanto a la proteína WT1, por ejemplo, se han referido los siguientes péptidos antigénicos cancerosos que se presentan uniéndose al MHC de clase II (véanse los documentos relacionados con patentes 3 - 5).

35

péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇: KRYFKLSHLQMHSRKH (Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His) (SEQ ID NO: 8),

40

péptido WT1₃₂₈₋₃₄₉: PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHGTG (Pro-Gly-Cys-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His-Thr-Gly) (SEQ ID NO: 10),
 péptido WT1₁₂₂₋₁₄₀: SGQARMFPNAPYLPSCLES (Ser-Gly-Gln-Ala-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-Pro-Ser-Cys-Leu-Glu-Ser) (SEQ ID NO: 11) y similares.

En cuanto al antígeno vacunal de WT1, se utiliza principalmente una proteína antigénica como tal o el péptido antigénico derivado de la proteína antigénica mencionada anteriormente (véase el documento no relacionado con patentes 2). Dado que una vacuna contra el cáncer que utiliza una proteína generalmente contiene varios péptidos antigénicos cancerosos, puede inducir simultáneamente una pluralidad de CTL y células T auxiliares. Por otro lado, dado que la vacuna de proteína cancerosa posee problemas en el suministro estable y el control de calidad, los péptidos que facilitan la producción y el control de calidad se utilizan ampliamente como antígeno canceroso de WT1. Sin embargo, en general, dado que las vacunas de péptidos convencionales están constituidas principalmente por un único antígeno peptídico presentado por el MHC de clase I, se ha señalado en los últimos años que la inducción eficaz de CTL requiere una mejora adicional (véase el documento no relacionado con patentes 3).

50

Uno de los medios de resolución es un péptido antigénico multivalente que presenta la vacuna contra el cáncer de péptido WT1. Como tal vacuna contra el cáncer de péptido, se ha referido una vacuna combinada que contiene una mezcla de una pluralidad de antígenos peptídicos presentados por el MHC de clase I y clase II (véase el documento no relacionado con patentes 4), una vacuna de péptido de cadena larga que contiene antígenos peptídicos presentados por el MHC de clase I y clase II, que están unidos por un enlace amida, y similares (véase el documento no relacionado con patentes 5). Sin embargo, en el caso de una vacuna combinada, dado que cada antígeno peptídico compuesto por varios aminoácidos muestra diversas propiedades, el desarrollo de una formulación óptima capaz de inducir eficazmente los CTL correspondientes a la misma es a menudo problemático. En el caso de una vacuna de péptido de cadena larga, la producción de la misma a veces plantea problemas, como proteína. Además, dado que los antígenos peptídicos presentados por la clase I y clase II están unidos a través de cualquier espaciador

60

peptídico en una vacuna de péptido de cadena larga, el control y la predicción de los sitios de escisión por la enzima intracelular son difíciles. Mientras, se ha informado sobre un dímero peptídico en donde dos monómeros peptídicos están mutuamente unidos mediante un enlace disulfuro (véase el documento relacionado con patentes 6). El documento US 2006/0217297 describe un dímero peptídico de péptidos WT1 de 7 a 30 aminoácidos que es capaz de provocar una respuesta de CTL, sin embargo, solo se han ilustrado los homodímeros que comprenden dos copias del mismo péptido. Adicionalmente, dicho péptido debe contener al menos una cisteína en el extremo C o N. A diferencia de la vacuna combinada, están unidos dos péptidos únicos, y por lo tanto, tienen una sola propiedad física y se pueden producir de manera conveniente. Por otra parte, para formar un producto conjugado, se requiere que los péptidos antigénicos cancerosos WT1 contengan cisteína en la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto, los que se pueden aplicar son limitados. Además, también se ha informado sobre un compuesto alterado obtenido condensando la cisteína N-terminal del péptido antígeno canceroso con cisteína, glutatión o ácido tioglicólico mediante un enlace disulfuro (véase el documento relacionado con patentes 7).

El procedimiento de presentación del péptido antigénico canceroso sobre el MHC de clase I implica una pluralidad de peptidasas. De tales peptidasas, la aminopeptidasa del retículo endoplásmico 1 (en lo sucesivo denominada ERAP1) es una de las enzimas de recorte en el retículo endoplasmático (en lo sucesivo denominado RE), y se ha referido que reconoce una secuencia peptídica de antígeno particular y la longitud de péptido, y escinde el precursor del péptido antigénico canceroso del extremo N para controlar que la longitud sea óptima para unirse al MHC de clase I (véanse los documentos relacionados con patentes 6-8). Sin embargo, hasta la fecha no hay ningún informe sobre un precursor de antígeno canceroso de péptido WT1 que contenga cisteína, cuya longitud se controle desde el extremo N, mediante la función de recorte de ERAP1.

[Lista de documentos]

[Documentos relacionados con patentes]

Documento relacionado con patentes 1: WO 00/06602
 Documento relacionado con patentes 2: WO 00/18795
 Documento relacionado con patentes 3: WO 2005/045027
 Documento relacionado con patentes 4: WO 2007/047764
 Documento relacionado con patentes 5: WO 2007/120673
 Documento relacionado con patentes 6: WO 2004/063217
 Documento relacionado con patentes 7: WO 2007/063903

[Documentos no relacionados con patentes]

Documento no relacionado con patentes 1: The Journal of Immunology, 2000; 164(4); 1873-1880
 Documento no relacionado con patentes 2: The oncologist, 2012; 17(2); 250-259
 Documento no relacionado con patentes 3: Cancer Journal, 2011; 17(5); 343-350
 Documento no relacionado con patentes 4: Blood, 2010; 166(2); 171-179
 Documento no relacionado con patentes 5: Cancers, 2011; 3; 3991-4009
 Documento no relacionado con patentes 6: Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 2005; 102(47); 17107-17112
 Documento no relacionado con patentes 7: The Journal of Immunology, 2009; 183; 5526-5536
 Documento no relacionado con patentes 8: The Journal of Immunology, 2010; 184; 4725-4732

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

El problema a resolver mediante la presente invención es proporcionar una vacuna conjugada de WT1 que induzca los CTL de forma eficaz.

Medios para resolver los problemas

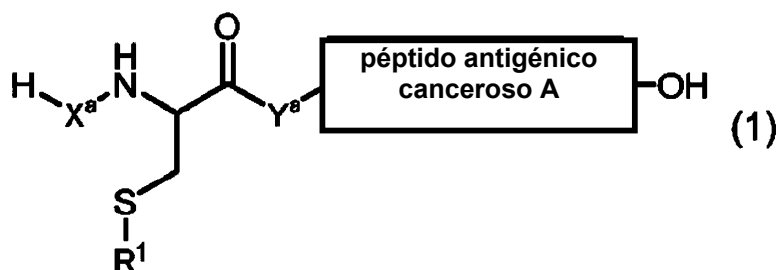
Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios intensivos en un intento de resolver el problema mencionado anteriormente, y han concebido, al considerar la adopción de vacuna conjugada, la idea de añadir cisteína al péptido antigénico canceroso WT1, y han confirmado adicionalmente que los resultados de las pruebas farmacológicas y similares utilizando el modelo animal vivo sugieren fuertemente que ERAP1 escinde la cisteína del extremo N-terminal de un precursor peptídico del antígeno canceroso WT1 generado por la escisión reductora intracelular del enlace disulfuro, para convertirlo de manera eficaz en un péptido antigénico canceroso, lo que a su vez llevó al hallazgo de un péptido antigénico polivalente que presenta una vacuna conjugada capaz de inducir los CTL en el organismo, y a la finalización de la presente invención.

Para ser específicos, durante el procedimiento de estudio de los medios de resolución del problema mencionado anteriormente, obtuvieron la idea de un método para introducir cisteína, que es necesaria para formar un producto conjugado de dos péptidos antigénicos cancerosos de WT1 diferentes, en cualquier posición N-terminal o C-terminal, sin influir en la presentación del antígeno por el MHC de clase I. Como resultado de un estudio posterior, han creado un péptido al introducir 0 - 5 aminoácidos que contienen cisteína en el extremo N de un péptido antigénico canceroso WT1, y un producto conjugado de los péptidos que contienen un enlace disulfuro a través de cisteína. Además, los autores de la presente invención han confirmado por primera vez que dicho péptido y el producto conjugado son susceptibles de ser recortados por ERAP1 in vitro y/o in vivo, lo que a su vez da como resultado la formación de un péptido antigénico canceroso, y por lo tanto, completaron la presente invención.

Aunque se ha deseado el desarrollo de un nuevo péptido antigénico de WT1 multivalente que presente una vacuna contra el cáncer de péptido, que se pueda producir fácilmente, sea aplicable a varios e induzca los CTL con alta eficacia, el producto conjugado inventado por los autores de la presente invención ha permitido el desarrollo de una vacuna conjugada de WT1 que induce los CTL de manera eficaz, tiene una propiedades fisicoquímicas superiores, se puede producir fácilmente, facilita la gestión de la producción y es aplicable a varios.

Por consiguiente, la presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas y se refiere a lo siguiente.

1. Un compuesto representado por la fórmula (1):



en donde X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo, el péptido antigénico canceroso A es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a Y^a en la fórmula (1), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (1),

R¹ es un péptido antigénico canceroso C,

el péptido antigénico canceroso C tiene una secuencia diferente de la del péptido antigénico canceroso A, que es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

y un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso C se une al grupo tioéter en la fórmula (1),

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. El compuesto de acuerdo con 1, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (4):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de acuerdo con 1, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (5):



5

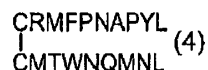
en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 4, que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

20
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
 WAPVLDFAAPPASAYGLC (SEQ ID NO: 243).

6. La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 5, en donde la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (4):



30

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 5, en donde la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (5):



35

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 5, en donde la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (4):

40



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos: WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

45

9. La composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 5, en donde la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (5):



50

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos: WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

55

10. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 4-9, para su uso en el tratamiento del cáncer que expresa el gen WT1 o el cáncer asociado con un aumento en el nivel de expresión del gen WT1.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 4-9, para su uso en la inducción de CTL en la inmunoterapia celular contra el cáncer.

5 12. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 4-9, para su uso como vacuna contra el cáncer.

10 13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de los apartados 10-12, en donde el cáncer es cáncer hematológico seleccionado entre leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, o cáncer sólido seleccionado entre cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y tumor cerebral.

15 14. Una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto representado por la fórmula (4):



20 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un compuesto representado por la fórmula (5):



25 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

30 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
WAPVLDFAPPGASAYGLC (SEQ ID NO: 243).

35 15. La composición de acuerdo con el apartado 14, en donde la composición comprende el compuesto representado por la fórmula (4):



40 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

16. La composición de acuerdo con el apartado 14, en donde la composición comprende el compuesto representado por la fórmula (5):



45 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

50 17. La composición de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 14-16, en donde la composición comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos:

55 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
WAPVLDFAPPGASAYGLC (SEQ ID NO: 243).

18. La composición de acuerdo con el apartado 14 que comprende el compuesto representado por la fórmula (4):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

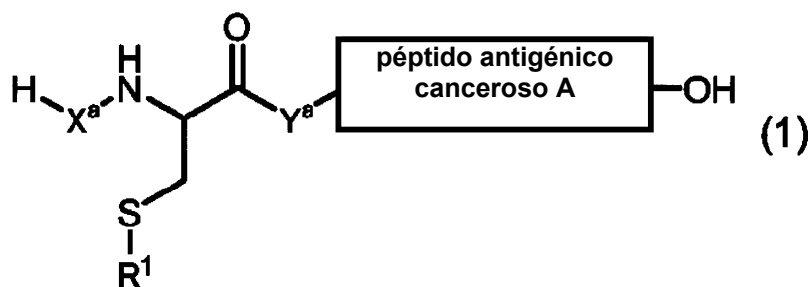
19. La composición de acuerdo con el apartado 14 que comprende un compuesto representado por la fórmula (5):



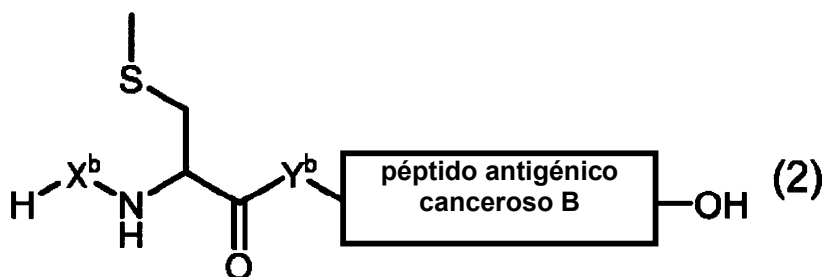
en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

1. En la presente memoria se describe adicionalmente:

1a. Un compuesto representado por la fórmula (1):



en donde X^a e Y^a son cada uno independientemente un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido, y un total del número de residuos de aminoácido para X^a y el número de residuo de aminoácido para Y^a es un número entero de 0 a 4, el péptido antigénico canceroso A es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido, un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a Y^a en la fórmula (1), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (1), R^1 es un átomo de hidrógeno, un grupo representado por la fórmula (2):



en donde X^b e Y^b son cada uno independientemente un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido, y un total del número de residuos de aminoácido para X^b y el número de residuo de aminoácido para Y^b es un número entero de 0 a 4, el péptido antigénico canceroso B tiene una secuencia diferente de la del péptido antigénico canceroso A, y es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 a 30 residuos de aminoácido, un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso B se une a Y^b en la fórmula (2), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso B se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (2), y un grupo tioéter en la fórmula (2) se une a un grupo tioéter en la fórmula (1), o péptido antigénico canceroso C, en donde el péptido antigénico canceroso C tiene una secuencia diferente de la del péptido

antigénico canceroso A, y es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína o un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína, y un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso C se une a un grupo tioéter en la fórmula (1),

siempre que cuando R^1 es un átomo de hidrógeno, la secuencia de un compuesto representado por la fórmula (1) no es la misma que la secuencia parcial de una proteína WT1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

2a. el compuesto de acuerdo con el apartado 1a, en donde X^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido e Y^a es un enlace sencillo, o X^a e Y^a son cada uno independientemente un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^a es un enlace sencillo e Y^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido o X^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido e Y^a es un enlace sencillo, o X^a es un enlace sencillo e Y^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

3a. el compuesto de acuerdo con el apartado 1a o 2a, en donde X^a es un enlace sencillo, e Y^a es un enlace sencillo, un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

4a. el compuesto de acuerdo con el apartado 1a o 2a, en donde X^a es un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido, e Y^a es un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5a. el compuesto de acuerdo con cualquiera de los apartados 1a - 4a, en donde X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

6a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 5a, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

7a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 6a, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), o

un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

8a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 7a, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

9a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a, en donde R^1 es un átomo de hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 9a, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13),
CCMTWNQMNL (SEQ ID NO: 14),
CCYTWNQMNL (SEQ ID NO: 15),
CALLPAVPSL (SEQ ID NO: 16),
CSLGEQQYSV (SEQ ID NO: 17) y

CRVPGVAPTL (SEQ ID NO: 18),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

11a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a, en donde R¹ es un grupo representado por la fórmula (2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

12a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a, en donde X^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido e Y^b es un enlace sencillo, o X^b e Y^b son cada uno independientemente un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^b es un enlace sencillo e Y^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido o X^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido e Y^b es un enlace sencillo, o X^b es un enlace sencillo e Y^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^b e Y^b son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

13a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 12a, en donde X^b es un enlace sencillo, e Y^b es un enlace sencillo, un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

14a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 12a, en donde X^b es un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido, e Y^b es un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 14a, en donde X^b e Y^b son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

16a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 15a, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

17a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 16a, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), o

un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, o sal farmacéuticamente aceptable del mismos;

18a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 17a, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

19a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 11a - 18a, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (3):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a, en donde R¹ es el péptido antigénico C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

21a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a-8a y 20a, en donde el péptido antigénico canceroso C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7-15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

22a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 20a - 21a, en donde el

péptido antigénico C es un péptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3), o

5 un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

10 23a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 20a - 22a, en donde el péptido C antigénico es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

24a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 20a - 23a, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (4):



20 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o un compuesto representado por la fórmula (5):



25 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 25a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a y 20a, en donde el péptido antigénico C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 14 - 30 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 26a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a, 20a y 25a, en donde el péptido antigénico C es un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
40 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), o

45 un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 10 - 11 y 19 - 24 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene actividad de inducción de células T auxiliares, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50 27a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a, 20a y 25a - 26a, en donde el péptido antigénico canceroso C es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
55 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
60 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y

CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 28a. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 8a, 20a y 25a - 27a, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (6):



10 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (7):



15 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (8):



20 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o un compuesto representado por la fórmula (9):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25 29a. una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 28a, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable;

30a. la composición farmacéutica de acuerdo con 29a, que se utiliza como vacuna contra el cáncer;

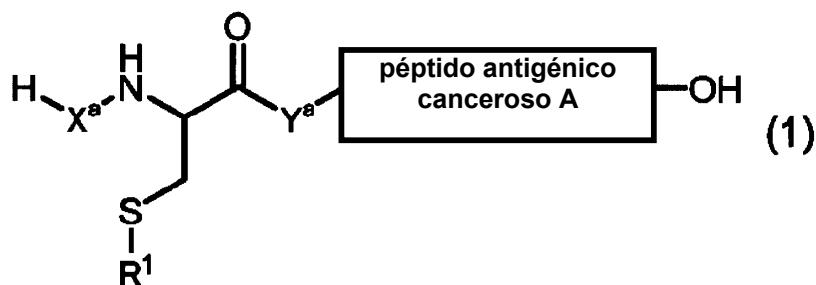
30 31a. el uso del compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 28a o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de una vacuna contra el cáncer;

32a. un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 28a o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un paciente con cáncer positivo para WT1 que lo necesite; y

35 33a. un método para obtener dos epítopos restringidos al MHC de clase I, o un epítipo restringido al MHC de clase I y un epítipo restringido al MHC de clase II, que comprende hacer reaccionar el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1a - 28a o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con ERAP1.

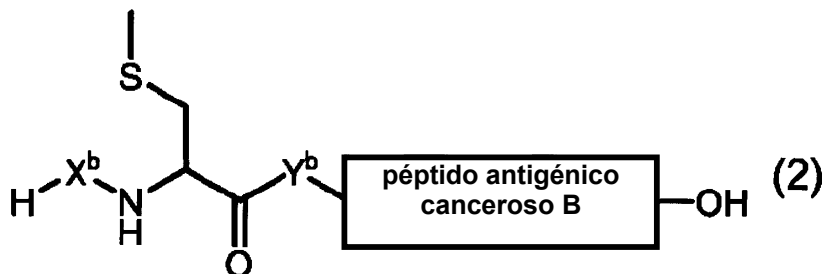
40 2. También se describe en la presente memoria:

1b. Un compuesto representado por la fórmula (1):



45 en donde X^a e Y^a son cada uno independientemente un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido, y un total del número de residuos de aminoácido para X^a y el número de residuo de aminoácido para Y^a es un número entero de 0 a 4, el péptido antigénico canceroso A es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7

- 30 residuos de aminoácido, un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a Y^a en la fórmula (1), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (1), R^1 es un átomo de hidrógeno, un grupo representado por la fórmula (2):



10 en donde X^b e Y^b son cada uno independientemente un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido, y un total del número de residuos de aminoácido para X^b y el número de residuo de aminoácido para Y^b es un número entero de 0 a 4, el péptido antigénico canceroso B tiene una secuencia diferente de la secuencia del péptido antigénico canceroso A y es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido, un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso B se une a Y^b en la fórmula (2), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso B se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (2), y un grupo tioéter en la fórmula (2) se une a un tioéter grupo en la fórmula (1), o péptido antigénico canceroso C,

15 en donde el péptido antigénico canceroso C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I diferente en secuencia del péptido antigénico canceroso A y que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína o un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína, y un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido C antígeno canceroso se une a un grupo tioéter en la fórmula (1), siempre que cuando R^1 es un átomo de hidrógeno, la secuencia del compuesto representado por la fórmula (1) no es la misma que la secuencia parcial de una proteína WT1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 2b. el compuesto de acuerdo con el apartado 1b, en donde X^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido e Y^a es un enlace sencillo, o X^a e Y^a son cada uno independientemente un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^a es un enlace sencillo e Y^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido o X^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido e Y^a es un enlace sencillo, o X^a es un enlace sencillo e Y^a es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

25 3b. el compuesto de acuerdo con los apartados 1b o 2b, en donde X^a es un enlace sencillo, e Y^a es un enlace sencillo, un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 4b. el compuesto de acuerdo con los apartados 1b o 2b, en donde X^a es un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido, e Y^a es un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 5b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 4b, en donde X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 6b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 5b, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45 7b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 6b, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

50 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), o

55 un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de

aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 8b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 7b, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

10 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

9b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, en donde R¹ es un átomo de hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 10b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 9b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

25 CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13),
CCMTWNQMNL (SEQ ID NO: 14),
CCYTWNQMNL (SEQ ID NO: 15),
CALLPAVPSL (SEQ ID NO: 16),
CSLGEQQYSV (SEQ ID NO: 17) y
CRVPGVAPTL (SEQ ID NO: 18),

30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

11b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, en donde R¹ es un grupo representado por la fórmula (2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 12b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b, en donde X^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido e Y^b es un enlace sencillo, o X^b e Y^b son cada uno independientemente un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^b es un enlace sencillo e Y^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido o X^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido e Y^b es un enlace sencillo, o X^b es un enlace sencillo e Y^b es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^b e Y^b son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 13b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 12b, en donde X^b es un enlace sencillo, e Y^b es un enlace sencillo, un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45 14b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 12b, en donde X^b es un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido, e Y^b es un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 14b, en donde X^b e Y^b son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50 16b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 15b, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

17b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 16b, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

55 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), o

60 un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

18b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 17b, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

5 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
 CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),
 ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
 10 SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
 RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

19b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 18b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (3):

15

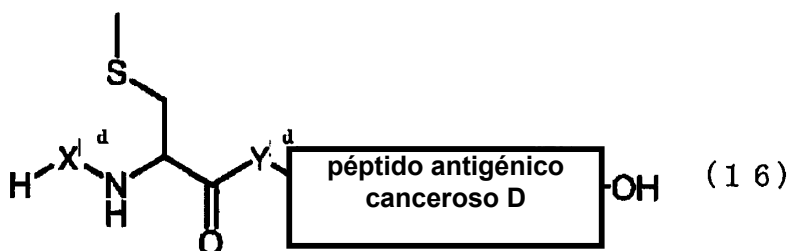


en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20b. el compuesto de acuerdo con el apartado 13b, en donde Y^b es un residuo de alanina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

21b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 11b - 13b y 20, en donde, cuando el péptido antigénico canceroso B es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que contiene un residuo de cisteína, el grupo tioéter en el péptido antigénico canceroso B está unido al grupo tioéter en la fórmula (16):

25



30 en donde X^d e Y^d son cada uno independientemente un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido, y un total del número de residuos de aminoácido para X^d y el número de residuo de aminoácido para Y^d es un número entero de 0 a 4, el péptido antigénico canceroso D es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido, un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido D antígeno de cáncer se une a Y^d en la fórmula (16), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso D se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (16), o al grupo tioéter del residuo cisteína del péptido antigénico canceroso E, que es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 22b. el compuesto de acuerdo con 21b, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 23b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 22b, en donde el péptido antigénico canceroso B es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

45

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50 24b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 23b, en donde X^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido e Y^d es un enlace sencillo, o X^d e Y^d son cada uno independientemente un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^d es un enlace sencillo e Y^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido o X^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido e Y^d es un enlace

sencillo, o X^d es un enlace sencillo e Y^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^d e Y^d son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 25b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 24b, en donde X^d es un enlace sencillo, Y^d es un enlace sencillo, un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

26b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 24b, en donde X^d es un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en un residuo de aminoácido, e Y^d es un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

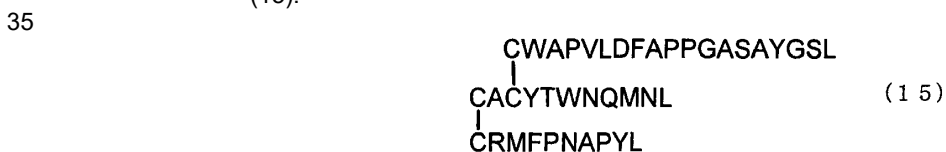
10 27b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 26b, en donde X^d e Y^d son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

28b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 27b, en donde el péptido antigénico canceroso D es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 14 - 30 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15 29b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 28b, en donde el péptido antigénico canceroso D es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

20 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 25 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) y
 WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244), o una sal farmacéuticamente aceptable del
 30 mismo;

30b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, 11b - 13b y 20b - 29b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (15):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 31b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 23b, en donde el péptido antigénico canceroso E es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 14 - 30 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45 32b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de 21b - 23b y 31b, en donde el péptido antigénico canceroso E es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

50 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
 55 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

33b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, en donde R^1 es el péptido antigénico C, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

60 34b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 33b, en donde el

péptido antigénico C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 35b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 33b - 34b, en donde el péptido antigénico C es un péptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3), o

un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

36b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 33b - 35b, en donde el péptido antigénico C es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

37b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 33b - 36b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (4):

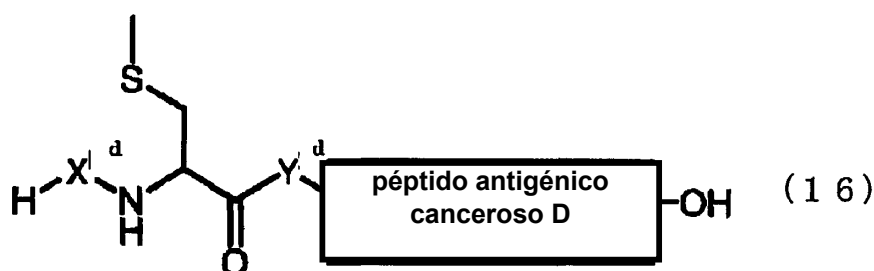


en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o un compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

38b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 33b, en donde, cuando el péptido que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína está unido adicionalmente al extremo N-terminal del péptido antigénico C, el grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido unido al extremo N-terminal del péptido antigénico C se une al grupo tioéter en la fórmula (16):



en donde X^d e Y^d son cada uno independientemente un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido, y un total del número de residuos de aminoácido para X^d y el número de residuo de aminoácido para Y^d es un número entero de 0 a 4, el péptido antigénico canceroso D es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido, un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido D antigéno de cáncer se une a Y^d en la fórmula (16), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso D se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (16), o al grupo tioéter del residuo cisteína del péptido antigénico canceroso E, que es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

39b. el compuesto de acuerdo con el apartado 38b, en donde el péptido que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína unido al extremo N-terminal del péptido antigénico C es un dipéptido que consiste en CA, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 39b, en donde el péptido antigénico C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 15 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 41b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 40b, en donde el péptido antigénico C es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

42b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 41b, en donde X^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 2 residuos de aminoácido e Y^d es un enlace sencillo, o X^d e Y^d son cada uno independientemente un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^d es un enlace sencillo e Y^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 2
15 residuos de aminoácido o X^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido e Y^d es un enlace sencillo, o X^d es un enlace sencillo e Y^d es un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido o X^d e Y^d son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 43b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 42b, en donde X^d es un enlace sencillo, e Y^d es un enlace sencillo, un residuo de alanina, un residuo de leucina o un residuo de metionina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

44b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 42b, en donde X^d es un enlace sencillo o un grupo peptídico divalente que consiste en 1 residuo de aminoácido, e Y^d es un
25 enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 44b, en donde X^d e Y^d son cada uno un enlace sencillo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

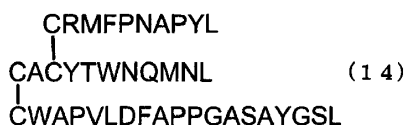
46b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 45b, en donde el péptido antigénico canceroso D es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 14 - 30
30 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

47b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 46b, en donde el péptido antigénico canceroso D es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

35 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
40 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
45 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) y
WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

50 48b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 47b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (14):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro,

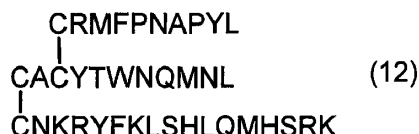
55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

49b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 41b y 44b, en donde el péptido antigénico canceroso E es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

60 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),

5 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24)

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 50b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 38b - 41b y 49b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (12):



15 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

51b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b y 33b, en donde el péptido antigénico C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 14 - 30 residuos de aminoácido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 52b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, 33b y 51b, en donde el péptido antigénico C es un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

25 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 30 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), o

35 un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 10 - 11 y 19 - 24 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene actividad de inducción de células T auxiliares, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

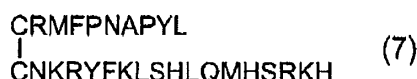
40 53b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, 33b y 51b - 52b, en donde el péptido antigénico canceroso C es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

45 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 50 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),

55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 54b. el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 8b, 33b y 51b - 53b, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (6):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (7):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (8):

5



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o un compuesto representado por la fórmula (9):

10



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro,
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
55b. una forma alterada de un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30
residuos de aminoácido;
56. la forma alterada de acuerdo con 55b, que es la siguiente secuencia de aminoácidos:

15

CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) o
WAPVLDFAAPPASAYGSLC (SEQ ID NO: 243);

20

57b. un compuesto representado por la fórmula (10):



25

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro,
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
58b. una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un
compuesto representado por la fórmula (3):

30



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (4):

35



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un compuesto representado por la fórmula (5):

40



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un péptido que consiste en una secuencia
de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

45

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
WAPVLDFAAPPASAYGSLC (SEQ ID NO: 243);

50

59b. una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de
los apartados 1b - 54b y 57b, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición de

acuerdo con el apartado 58b y un portador farmacéuticamente aceptable;

60b. la composición farmacéutica de acuerdo con 59b, que se utiliza como una vacuna contra el cáncer;

61b. el uso del compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 54b y 57b, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición de acuerdo con el apartado 58 para la producción de una vacuna contra el cáncer;

62b. un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 54b y 57b o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición de acuerdo con el apartado 58b con un paciente con cáncer positivo WT1 que lo necesite ;

63b. un método para obtener dos epítomos restringidos al MHC de clase I, o un epítomo restringido al MHC de clase I y un epítomo restringido al MHC de clase II, que comprende hacer reaccionar el compuesto de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1b - 54b y 57b o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con ERAP1; y

64b. un método para sintetizar un compuesto, que comprende las siguientes etapas:

(1) una etapa para sintetizar, utilizando Fmoc-C(Mmt)A-SBn y péptido antigénico C, un péptido en el que un grupo carbonilo del aminoácido C-terminal de C(Mmt)A y el grupo amino N-terminal del péptido C antígeno canceroso están unidos, en donde el péptido antigénico C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína o un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína,

(2) una etapa para sintetizar, utilizando el péptido obtenido en la etapa (1) mencionada anteriormente y el péptido antigénico canceroso A en donde un residuo de cisteína protegido por el grupo Npys está unido al extremo N-terminal, un péptido en donde un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso C en el péptido obtenido en la etapa (1) mencionada anteriormente y un grupo tioéter del residuo de cisteína unido al extremo N terminal del péptido antigénico canceroso A, en donde el péptido antigénico canceroso A es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido, y

(3) una etapa para sintetizar, utilizando el péptido obtenido en la etapa (2) mencionada anteriormente y el péptido antigénico canceroso D que contiene un residuo de cisteína protegido por el grupo Spy, un péptido en donde un grupo tioéter del residuo de cisteína se une al extremo N-terminal del péptido antigénico canceroso A en el péptido obtenido en la etapa (2) mencionada anteriormente y un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso D están unidos, en donde el péptido antigénico canceroso D es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína unido al extremo N-terminal o un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína.

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar el compuesto mencionado anteriormente representado por la fórmula (1) útil como agente inmunoterapéutico contra el cáncer (en lo sucesivo, algunas veces se denominará compuesto de la presente invención). De acuerdo con el compuesto de la presente invención, se pueden proporcionar vacunas contra el cáncer y agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer que inducen eficazmente CTL in vivo e in vitro. En concreto, de acuerdo con el compuesto de la presente invención, ahora es posible producir dos péptidos WT1 restringidos al MHC de clase I que tienen diferentes secuencias o dos epítomos de WT1 restringidos al MHC de clase I que tienen diferentes secuencias, un péptido WT1 restringido al MHC de clase I y un péptido WT1 restringido al MHC de clase II, un epítomo de WT1 restringido al MHC de clase I y un epítomo de WT1 restringido al MHC de clase II, dos péptidos WT1 restringidos al MHC de clase I y péptido WT1 restringido al MHC de clase II que tienen diferentes secuencias, o dos epítomos de WT1 restringidos al MHC de clase I y epítomo de WT1 restringido al MHC de clase II que tienen diferentes secuencias in vivo e in vitro e inducen eficazmente CTL.

En cuanto a los subtipos de HLA de dos péptidos WT1 restringidos al MHC de clase I que tienen una secuencia diferente, es particularmente preferible el compuesto de la presente invención (producto conjugado) obtenido combinando péptido de tipo A02 (A-0201, A0206 y similares) y péptido de tipo A24 (A-2402 y similares). En europeos y estadounidenses (caucásicos), la población del subtipo HLA-A0201 o del subtipo HLA-A0206 es la más alta y es aproximadamente 47%, el subtipo HLA-A2402 es aproximadamente 13%, y el total de estos subtipos ocupa aproximadamente 56%, excluyendo duplicados (es decir, cálculo duplicado de seres humanos que tienen ambos subtipos) (Human Immunol. 62:1009; 2001). En japoneses y similares, la población de HLA-A2402 es la más alta y es aproximadamente 60%, HLA-A0201 o HLA-A0206 es aproximadamente 39%, y el total de estos subtipos ocupa aproximadamente 81%, excluyendo duplicados (es decir, cálculo duplicado de humanos que tienen ambos subtipos) (www.bmdc.irc.or.jp/GF-A.htm). Por lo tanto, las ventajas del compuesto de la presente invención son, específicamente, que una población más grande está cubierta por un solo compuesto de la presente invención, y la

selección del subtipo de HLA de los pacientes antes de la administración no siempre es esencial y similares. En vista de tales ventajas del compuesto de la presente invención, es preferible un compuesto representado por la fórmula (4) o la fórmula (5), y es más preferible un compuesto representado por la fórmula (5).

- 5 Además, de acuerdo con el compuesto de la presente invención, se puede proporcionar un ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer con propiedades fisicoquímicas y estabilidad superiores, y de fácil producción y fácil control. Como resultado, se ha facilitado la formulación de la vacuna contra el cáncer.

10 Específicamente, los ejemplos de las propiedades fisicoquímicas incluyen la solubilidad, la viscosidad de la solución, la facilidad de purificación resultante consiguiente, su fácil manejo después de la liofilización, la facilidad de purificación resultante consiguiente y similares. La estabilidad incluye estabilidad después de la sustitución de sal, higroscopicidad, estabilidad térmica, estabilidad después de la formación de la emulsión y similares. La actividad farmacológica incluye la eficacia como vacuna contra el cáncer, la diferencia causada por el API (ingrediente farmacéutico activo), la interacción con el aditivo en preparación y similares. De estos, la diferencia causada por el API es una diferencia como vacuna contra el cáncer debido al API. Específicamente, en dos API que tienen solubilidades muy diferentes, el API con menor solubilidad es propenso a precipitar, y es fácil esperar que no se pueda realizar un tratamiento de esterilización por filtración con un filtro de membrana, que es un requisito esencial para los productos farmacéuticos. Incluso si un tratamiento de esterilización mediante filtración del API con pequeña solubilidad es apenas posible, se considera que la cantidad de API contenida en el producto filtrado disminuye marcadamente y la capacidad de inducción de CTL esencial para una vacuna contra el cáncer disminuye marcadamente. Por lo tanto, es fácilmente predecible el demérito de una notable disminución de la eficacia de producción de API con una solubilidad pequeña.

25 Breve descripción de los dibujos

25 La Fig. 1 es una Figura que muestra los resultados de prueba del Ejemplo Experimental 1 en cuanto al cambio dependiente del tiempo del recorte de aminoácidos N-terminal por ERAP1 de cada péptido de SEQ ID NO: 13, 16, 17 y 18 sintetizados en los Ejemplos 2 - 5.

30 La Fig. 2 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 2 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 3 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 2 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1, mediante ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402.

35 La Fig. 4 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 4 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (3) sintetizado en el Ejemplo 6, mediante ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

40 La Fig. 5 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 5 en cuanto a la capacidad de un compuesto representado por la fórmula (6) sintetizado en el Ejemplo 7 para inducir células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 24.

45 La Fig. 6 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 5 en cuanto a la capacidad de un compuesto representado por la fórmula (6) sintetizado en el Ejemplo 7 para inducir células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 24.

La Fig. 7 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 6 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (8) sintetizado en el Ejemplo 9 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

50 La Fig. 8 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 6 en cuanto a la capacidad de un compuesto representado por la fórmula (8) sintetizado en el Ejemplo 9 para inducir células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 in vivo, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 22.

55 La Fig. 9 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 8 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (7) sintetizado en el Ejemplo 8 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

60 La Fig. 10 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 8 en cuanto a la capacidad de un compuesto representado por la fórmula (7) sintetizado en el Ejemplo 8 para inducir células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 23 in vivo, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 en el estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 23.

La Fig. 11 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 9 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (9) sintetizado en el

Ejemplo 10 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 5, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 12 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 9 en cuanto a la capacidad de un compuesto representado por la fórmula (9) sintetizado en el Ejemplo 10 para inducir células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 24.

La Fig. 13 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Comparativo 1 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 238 y 239 sintetizados en los Ejemplos de Referencia 8 y 9 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 14 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Comparativo 1 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 238 y 239 sintetizados en los Ejemplos de Referencia 8 y 9 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 4, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402.

La Fig. 15 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Comparativo 2 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 240 y 241 sintetizados en los Ejemplos de Referencia 10 y 11 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 16 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Comparativo 2 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 240 y 241 sintetizados en los Ejemplos de Referencia 10 y 11 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 4, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402.

La Fig. 17 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 11 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (10) sintetizado en el Ejemplo 13 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 18 es una figura que muestra los resultados de la prueba del ejemplo comparativo 3 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (11) sintetizada en el Ejemplo de Referencia 12 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 19 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 12 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (12) sintetizado en el Ejemplo 14 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 20 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 12 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (12) sintetizado en el Ejemplo 14 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 4, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402.

La Fig. 21 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 13 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (14) sintetizado en el Ejemplo 15 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 22 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 13 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de un compuesto representado por la fórmula (14) sintetizado en el Ejemplo 15 en estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 4, mediante ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402.

La Fig. 23 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 14 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 sintetizado en el Ejemplo de referencia 1 en el estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante el ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 24 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 15 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 sintetizado en el Ejemplo de referencia 13 en el estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante el ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 25 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 16 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 sintetizado en el Ejemplo de Referencia 2 en el estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante el ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 26 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 17 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 sintetizado en el

Ejemplo 11 en el estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante el ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

La Fig. 27 es una Figura que muestra los resultados de la prueba del Ejemplo Experimental 18 en cuanto a la capacidad de inducción de CTL in vivo de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 sintetizado en el Ejemplo 11 en el estado pulsado o no pulsado con el péptido de SEQ ID NO: 2, mediante el ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201.

Descripción de realizaciones

La realización de la presente invención se explica en detalle a continuación.

El "residuo de aminoácido" en la presente invención significa una región que corresponde a una unidad de aminoácido que constituye un péptido o proteína en un péptido o molécula de proteína. Los ejemplos del "residuo de aminoácido" incluyen residuo de μ -aminoácido, residuo de β -aminoácido, residuo de γ -aminoácido o residuo de δ -aminoácido naturales o no naturales. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen residuo de α -aminoácido natural, residuo de ornitina, residuo de homoserina, residuo de homocisteína, β -alanina, ácido γ -aminobutanoico o ácido δ -aminopentanoico y similares. Cuando el "residuo de aminoácido" puede ser una sustancia ópticamente activa, puede ser cualquiera de una forma L y una forma D, y es preferible una forma L.

Cuando el "residuo de aminoácido" en la presente invención se muestra en abreviatura, se utilizan las siguientes abreviaturas.

Ala o A: residuo de alanina
 Arg o R: residuo de arginina
 Asn o N: residuo de asparragina
 Asp o D: residuo de ácido aspártico
 Cys o C: residuo de cisteína
 Gln o Q: residuo de glutamina
 Glu o E: residuo de ácido glutámico
 Gly o G: residuo de glicina
 His o H: residuo de histidina
 Ile o I: residuo de isoleucina
 Leu o L: residuo de leucina
 Lys o K: residuo de lisina
 Met o M: residuo de metionina
 Phe o F: residuo de fenilalanina
 Pro o P: residuo de prolina
 Ser o S: residuo de serina
 Thr o T: residuo de treonina
 Trp o W: residuo de triptófano
 Tyr o Y: residuo de tirosina
 Val o V: residuo de valina
 Abu: residuo de ácido 2-aminobutírico (que también será referido como residuo de ácido α -aminobutírico)
 Orn: residuo de ornitina
 Cit: residuo de citrulina

La secuencia de aminoácidos del "péptido" en la presente invención se describe de acuerdo con el método convencional, en donde el residuo de aminoácido del aminoácido N-terminal se coloca en el lado izquierdo y el residuo de aminoácido del extremo C-terminal el aminoácido se coloca en el lado derecho. En el "péptido", a menos que esté particularmente indicado, el grupo amino del residuo de aminoácido del aminoácido N-terminal está unido al átomo de hidrógeno, y el grupo carbonilo del residuo de aminoácido del aminoácido C-terminal está unido a grupo hidroxilo. El grupo divalente del péptido significa un grupo de unión a través del grupo amino del residuo de aminoácido del aminoácido N-terminal y el grupo carbonilo del residuo de aminoácido del aminoácido C-terminal.

En el compuesto al que se hace referencia en la presente memoria, por ejemplo, en los compuestos representados por las fórmulas (3) - (9) y en relación con el péptido, que es una estructura parcial del mismo, a menos que esté particularmente indicado, el grupo amino del residuo de aminoácido del aminoácido N-terminal está unido al átomo de hidrógeno, y el grupo carbonilo del residuo de aminoácido del aminoácido C-terminal está unido al grupo hidroxilo.

"X^a" e "Y^a" en la presente invención son cada uno un enlace sencillo. También se describe aquí que "X^a" e "Y^a" significan, independientemente, un enlace sencillo o un grupo divalente de péptidos que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido. La suma del número de residuos de aminoácido de X^a y el de Y^a es un número entero de 0 a 4. Por

ejemplo, que un número entero de dicha suma sea 0 significa que X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo. Cuando la suma es un número entero de 4, sus ejemplos incluyen que X^a e Y^a sean independientemente grupos divalentes de péptido que consisten en 2 residuos de aminoácido, que X^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 3 residuos de aminoácido que Y^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido, que X^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 4 residuos de aminoácido y que Y^a sea un enlace sencillo y similares.

El número entero de dicha suma es preferiblemente 0-2, más preferiblemente 0-1, lo más preferiblemente 0. Es decir, X^a e Y^a son más preferiblemente enlaces sencillos.

Cuando la suma es un número entero de 2, los ejemplos de los mismos incluyen que X^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 2 residuos de aminoácido y que Y^a sea un enlace sencillo, que X^a e Y^a sean independientemente grupos de péptidos divalentes que consisten en 1 residuo de aminoácido o que X^a sea un enlace sencillo y que Y^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 2 residuos de aminoácido.

Cuando la suma es un número entero de 1, los ejemplos de los mismos incluyen que X^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido y que Y^a sea un enlace sencillo, y que X^a sea un enlace sencillo y que Y^a sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido. De estos, se prefiere que X^a sea un enlace sencillo y que Y^a sea un residuo de alanina, residuos de leucina o residuo de metionina.

El "péptido antigénico canceroso A" en la presente invención se define como en las reivindicaciones adjuntas. También se describe que el "péptido antigénico canceroso A" es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido. En el péptido A del antígeno canceroso en la fórmula (1), el grupo amino del aminoácido N-terminal está unido a Y^a en la fórmula (1) y el grupo carbonilo del aminoácido C-terminal está unido al grupo hidroxilo en la fórmula (1).

El término "restringido al MHC de clase I" según se utiliza en la presente memoria significa la propiedad de inducir CTL mediante la unión a una molécula de MHC de clase I que es la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

El MHC en seres humanos se denomina antígeno leucocitario humano (HLA). El HLA correspondiente a la molécula del MHC de clase I se clasifica en subtipos HLA-A, B, Cw, F y G y similares. Los ejemplos preferibles del "restringido al MHC de clase I" incluyen restringido a HLA-A, restringido a HLA-B y restringido a HLA-Cw.

Se conoce el polimorfismo (alelo) de cada subtipo de HLA. Los ejemplos del polimorfismo de HLA-A incluyen no menos de 27 tipos tales como HLA-A1, HLA-A0201, HLA-A24 y similares, los ejemplos del polimorfismo de HLA-B incluyen no menos de 59 tipos tales como HLA-B7, HLA-B40, HLA-B4403 y similares, y los ejemplos del polimorfismo de HLA-Cw incluyen no menos de 10 tipos tales como HLA-Cw0301, HLA-Cw0401, HLA-Cw0602 y similares. Entre estos polimorfismos, son preferibles HLA-A0201 y HLA-A24.

El "péptido WT1" en la presente invención es un péptido parcial que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido continuos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano descrito en SEQ ID NO: 1.

Por lo tanto, el "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" en la presente invención es un péptido que se une a un antígeno del MHC de clase I in vitro y/o in vivo y se presenta como un complejo, e induce CTL como resultado del reconocimiento del complejo por las células T precursoras. El número de residuos de aminoácido del "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" descrito en la presente memoria es 7 - 30, preferiblemente 7 - 15, más preferiblemente 8 - 12, más preferiblemente 8 - 11, más preferiblemente 8 o 9.

El "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" que consiste en 7-12 o preferiblemente 9 residuos de aminoácido también se denomina "un epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I". El "epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I" en la presente invención significa un péptido per se que se une a un antígeno del MHC de clase I y se presenta como un complejo. Es decir, el "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" produce "epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I" in vitro y/o in vivo, mediante descomposición intracelular del compuesto de la presente invención por proteosoma y/o proteasa tal como TioI Reductasa Lisosomal inducible por Interferón Gamma (GILT, GLT) y similares (proteólisis, escisión reductiva del enlace disulfuro), y/o escisión en el número óptimo de residuos (también llamado recorte) por la aminopeptidasa del retículo endoplásmico 1 (ERAP1, ER-aminopeptidasa 1). En esta producción, se consideran principalmente un procedimiento de producción en donde el aminoácido C-terminal del "epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I" resulta primero de la degradación por proteosoma y/o proteasa, después de lo cual el aminoácido N-terminal del "epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I" resulta del recorte (escisión) por ERAP1. En esta producción, sin embargo, también es posible un procedimiento que no sea este procedimiento de producción. En la actualidad, ERAP1 también se conoce como ERAAP (aminopeptidasa ER asociada a la presentación de antígenos), y solía denominarse también A-LAP, PILS-AP o ARTS-1.

ES 2 691 091 T3

Por lo tanto, el "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" es preferiblemente un péptido que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido producidos por la adición de 1 - 23 residuos de aminoácido al grupo carbonilo del aminoácido C - terminal del "epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I" que consiste en 7-12 residuos de aminoácido.

5 Los ejemplos del "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" incluyen péptidos descritos en las Tablas 1 - 44. En cada Tabla, la "posición" significa una posición en la secuencia de aminoácidos de WT1 humana descrita en SEQ ID NO: 1.

Tabla 1

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
2-10	GSDVRDLNA	26	A1
3-11	SDVRDLNAL	27	B40, B60, B61, B3701, B4403, Cw0301, Cw0602
4-12	DVRDLNALL	28	A24, A68.1, A3302, B7, B8, B3501, B3701, Cw0401, Cw0602
6-14	RDLNALLPA	29	B40, B61, B3701
7-15	DLNALLPAV	30	A0201, B62, B5201
10-18	ALLPAVPSL	5	A0201, A0205, A24, A3, B14, B7, B8, B3801, B3901, B3902, Cw0301, Cw0401, Cw0602

10

Tabla 2

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
17-25	SLGGGGGCA	31	B62
18-26	LGGGGGCAL	32	B60, B7, B3801, B5101, B5102
20-28	GGGGCALPV	33	B61, B5101, B5102, B5201

Tabla 3

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
23-31	GCALPVSGA	34	B40, B61
24-32	CALPVSGAA	35	B40, B5102, Cw0301
26-34	LPVSGAAQW	36	B40, B3501, B5801
29-37	SGAAQWAPV	37	B5101, B5102, B5201, B61
30-38	GAAQWAPVL	38	B40, B60, B7, B8, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0602

Tabla 4

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
32-40	AQWAPVLDF	39	A3, A3101, B62, B2702, B2705, B3902, B5201
33-41	QWAPVLDF	40	Cw0702
37-45	VLDFAPPGA	41	A1, A0201
38-46	LDFAPPGAS	42	B40, B3701
39-47	DFAPPGASA	43	Cw0401
40-48	FAPPGASAY	44	A1, B62, B3501, B4403, B5801, Cw0702

ES 2 691 091 T3

Tabla 5

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
147-55	AYGSLGGPA	45	A24

Tabla 6

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
63-71	PPPPPHSF	46	Cw0401
64-72	PPPPHSFI	47	B5101, B5102, B5201
65-73	PPPPHSFIK		A1101
70-78	SFIKQEPSW	49	Cw0401

Tabla 7

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
73-81	KQEPSWGGA	50	A0205
80-88	GAEPHEEQC	51	A1, A1

Tabla 8

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
81-89	AEPHEEQCL	52	A0205, B40, B60, B61, B3701, B4403
82-90	EPHEEQCLS	53	B3501, B5101
83-91	PHEEQCLSA	54	B3801
84-92	HEEQCLSAF	55	B40, B3701, B4403, Cw0702
85-93	EEQCLSAFT	56	B40, B60, B61, B3701, B4403
86-94	EQCLSAFTV	57	A0201, B62, B5201
88-96	CLSAFTVHF	58	A3, B62

Tabla 9

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
92-100	FTVHFSGQF	59	B62, B5801, Cw0301
93-101	TVHFSGQFT	60	A0201, A0205
96-104	FSGQFTGTA	61	B5801, B4403
98-106	GQFTGTAGA	62	A0205, B40, B62, B2702, B5201
99-107	QFTGTAGAC	63	Cw0401
100-108	FTGTAGACR	64	A68.1, A1101, A3101, A3302

Tabla 10

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
101-109	TGTAGACRY	65	B62, B4403, Cw0702
104-112	AGACRYGPF	66	B4403, B5201
107-115	CRYGPFGPP	67	B2702
110-118	GPFGPPPPS	68	B5101, B5102

ES 2 691 091 T3

Tabla 11

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
118-126	SQASSGQAR	69	A68.1, A1101, A3101, A3302
119-127	QASSGQARM	70	B3501, B5101, B5102
120-128	ASSGQARMF	71	B3501, B3801, B4403, B5801

Tabla 12

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
123-131	GQARMFPNA	72	B62
125-133	ARMFPNAPY	73	B14, B2702, B2705, Cw0702
126-134	RMFPNAPYL	2	A0201, A0205, A24, A3, B14, B7, B2702, B2705, B3901, B3902, Cw0301
128-136	FPNAPYLPS	74	B5101
130-138	NAPYLPSCL	75	A24, B60, B7, B8, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0602, Cw0702

Tabla 13

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
136-144	SCLESQPAI	76	B8, B3901, B5102 Cw0301
137-145	CLESQPAIR	77	A1, A3, A68.1, A1101, A3101, A3302
138-146	LESQPAIRN		B60, B61
139-147	ESQPAIRNQ	78 79	A3302

Tabla 14

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
141-149	QPAIRNQGY	80	B8, B3501, B4403, Cw0401, Cw0702
143-151	AIRNQGYST	81	B7
144-152	IRNQGYSTV	82	B14, B2702, B2705, B3901
146-154	NQGYSTVTF	83	B62, B2702, B3902, B5201

Tabla 15

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
152-160	VTFDGTPSY	84	A1, A3, B62, B3501, B4403, B5801, Cw0702

Tabla 16

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
161-169	GHTPSHHAA	85	B3801
163-171	TPSHHAAQF	86	B3501, B3801, Cw0401, Cw0702
165-173	SHHAAQFPN	87	B3801
168-176	AAQFPNHSF	88	B5801
169-177	AQFPNHSFK	89	A3, A68.1, A1101, A3101, B2705

ES 2 691 091 T3

Tabla 17

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
174-182	HSFKHEDPM	90	B14, B3501, B5801
177-185	KHEDPMGQQ	91	B3801
179-187	EDPMGQQGS	92	B3701
180-188	DPMGQQGSL	93	A24, B14, B60, B7, B8, B3501, B3801, B3901, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0401, Cw0602

Tabla 18

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
185-193	QGSLGEQQY	94	B4403, Cw0702
187-195	SLGEQQYSV	6	A0201, A0205, A3, B62

Tabla 19

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
191-199	QQYSVPPP	95	A0201, A0205, B61, B62, B2702, B2705, B5201
192-200	QYSVPPPVY	96	A24, Cw0401, Cw0702
194-202	SVPPPVYGC	97	A0205, A3

Tabla 20

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
202-210	CHTPTDSCT	98	B3801
204-212	TPTDSCTGS	99	B5101
206-214	TDCTGSQA	100	B40, B61, B3701
207-215	DSCTGSQAL	101	A24, A3302, B60, B7, B8, B3501, B3901, B3902, Cw0602
208-216	SCTGSQALL	102	B60, B7, B8, B3701, B3801, B3901, B3902
209-217	CTGSQALLL	103	B60, B7, B3701, B3902
210-218	TGSQALLLR	104	A3302

Tabla 21

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
211-219	GSQALLLRT	105	B5801
213-221	QALLLRTPY	106	A1, B3501, B4403, B5801, Cw0602, Cw0702
217-225	LRTPYSSDN	107	B2702
218-226	RTPYSSDNL	108	A24, B60, B7, B3902, B5801
219-227	TPYSSDNLY	109	B3501, B5101, B5102, Cw0401, Cw0702

Tabla 22

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
221-229	YSSDNLYQM	110	B60, B3501
222-230	SSDNLYQMT	111	A1, B5801
223-231	SDNLYQMTS	112	B3701

ES 2 691 091 T3

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
225-233	NLYQMTSQL	113	A0201, A0205, A24, B14, B7, B8, B3801, B3901, B3902, Cw0301, Cw0602
227-235	YQMTSQLEC	114	A0201, A0205, B62
228-236	QMTSQLECM	115	A0201
230-238	TSQLECMTW	116	B5801

Tabla 23

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
232-240	QLECMTWNQ	117	A1
233-241	LECMTWNQM	118	B40, B60, B61, B3701, B4403
235-243	CMTWNQMNL	3	A0201, A0205, A24, A3, B7
239-247	NQMNLGATL	119	A0201, A0205, A24, B14, B60, B62, B7, B2702, B2705, B3901, B3902, B5201, Cw0301, Cw0602
240-248	QMNLGATLK	120	A24, A3, A1101, A3101

Tabla 24

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
242-250	NLGATLKGV	121	A0201, A0205, B62, Cw0602
243-251	LGATLKGVA	122	B5201
244-252	GATLKGVAA	123	B61, B8
250-258	VAAGSSSSV	124	B61, B5101, B5102

Tabla 25

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
251-259	AAGSSSSVK	125	A68.1, A1101
252-260	AGSSSSVKW	126	B5801
260-268	WTEGQSNHS	127	A1

Tabla 26

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
261-269	TEGQSNHST	128	B40, B60, B61, B4403
263-271	QQSNHSTGY	129	A3, B62, B2702, Cw0702
269-277	TGYESDNHT	130	B5102, B5201
270-278	GYESDNHTT	131	A24

Tabla 27

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
272-280	ESDNHTTPI	132	A1, A3302, B5101
273-281	SDNHTTPI	133	B40, B60, B3701, B5201
276-284	HTTPIILCGA	134	B5801
278-286	TPILCGAQY	135	B3501, B4403, Cw0401, Cw0702

ES 2 691 091 T3

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
279-287	PILCGAQYR	136	A3101
280-288	ILCGAQYRI	137	A0201, A0205, A3, B62, B5101

Tabla 28

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
285-293	QYRIHTHGV	138	A24, Cw0401
286-294	YRIHTHGVF	139	B14, B2702, B2705, B5201, Cw0301
287-295	RIHTHGVFR	140	A3, A1101, A3101, A3302
289-297	HTHGVFRGI	141	B5801

Tabla 29

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
292-300	GVFRGIQDV	142	A0201, A0205, A3, A68.1, A1101, B3901, B5102, B5201, Cw0602
293-301	VFRGIQDVR	143	A3101
294-302	FRGIQDVRR	144	B2705
295-303	RGIQDVRRV	145	B61, B5101, B5102, B5201, Cw0602
298-306	QDVRRVPGV	146	B61, B3701
299-307	DVRRVPGVA	147	A68.1, A3302, B7, B8

Tabla 30

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
301-309	RRVPGVAPT	148	B14, B2702, B2705, Cw0301
302-310	RVPGVAPTL	7	A0205, A24, B7, B3701, B3801, B3901, B3902
303-311	VPGVAPTLV	149	B7, B3501, B5102, B5201, Cw0401
306-314	VAPTLVRSA	150	B4403
309-317	TLVRSASET	151	A0201, A0205

Tabla 31

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
312-320	RSASETSEK	152	A68.1, A1101
313-321	SASETSEKR	153	A3101, A3302
315-323	SETSEKRPF	154	B40, B3701, B4403
316-324	ETSEKRPFM	155	B8, B3501
317-325	TSEKRPFMC	156	A1, B5801
318-326	SEKRPFMCA	157	B40, B60, B61, B4403
319-327	EKRPFMCAAY	158	Cw0602, Cw0702

Tabla 32

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
324-332	MCAYPGCNK	159	A68.1, A1101
325-333	CAYPGCNKR	160	A1, A68.1, A1101, A3101, A3302

ES 2 691 091 T3

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
326-334	AYPGCNKRY	161	A24, Cw0401, Cw0702
327-335	YPGCNKRYF	162	B3501, B3801, B5201, Cw0401, Cw0702
329-337	GCNKRYFKL	163	A24, B14, B60, B7, B8, B3902, Cw0301

Tabla 33

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
332-340	KRYFKLSHL	164	B14, B8, B2702, B2705, B3901, B3902, Cw0301, Cw0602
334-342	YFKLSHLQM	165	Cw0401
337-345	LSHLQMHSR	166	A68.1, A3302
340-348	LQMHSRKHT	167	A0201, A0205

Tabla 34

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
343-351	HSRKHTGEK	168	A68.1
345-353	RKHTGEKPY	169	Cw0702
347-355	HTGEKPYQC	170	B8, B5801
349-357	GEKPYQCDF	171	B40, B3701, B4403

Tabla 35

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
351-359	KPYQCDFKD	172	B5102
354-362	QCDFKDCER	173	A1, A68.1, A3101, A3302
356-364	DFKDCERRF	174	A24, Cw0401
358-366	KDCERRFSR	175	A3101

Tabla 36

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
362-370	RRFSRSDQL	176	B2702, B2705, B3901, Cw0301, Cw0602
363-371	RFSRSDQLK	177	A1101
364-372	FSRSDQLKR	178	A68.1, A3302
366-374	RSDQLKRHQ	179	A1
368-376	DQLKRHQRR	180	A68.1, A3101, A3302

Tabla 37

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
371-379	KRHQRRHTG	181	B14
372-380	RHQRRHTGV	182	B14, B3801, B3901
373-381	HQRRHTGVK	183	A1101, A3101, B2705
375-383	RRHTGVKPF	184	B2702, B2705, Cw0702
379-387	GVKPFQCKT	185	A68.1

ES 2 691 091 T3

Tabla 38

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
383-391	FQCKTCQRK	186	A3, A1101, A3101, B2705
384-392	QCKTCQRKF	187	B62, B8
386-394	KTCQRKFSR	188	A1, A3, A68.1, A1101, A3101
387-395	TCQRKFSRS	189	B8
389-397	QRKFSRSDH	190	B2702, B2705
390-398	RKFSRSDHL	191	B14, B3901, B3902, Cw0301

Tabla 39

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
391-399	KFSRSDHLK	192	A1101, A3101
394-402	RSDHLKTHT	193	A1, B5801
396-404	DHLKTHTRT	194	B3801, B3901

Tabla 40

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
401-409	HTRTHTGKT	195	B8
406-414	TGKTSEKPF	196	B5201
408-416	KTSEKPFSC	197	A0201, B5801
409-417	TSEKPFSCR	198	A1, A68.1, A3302
410-418	SEKPFSCRW	199	B40, B4403

Tabla 41

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
412-420	KPFSCRWPS	200	B3501, B5102
415-423	SCRWPCQK	201	A1101
416-424	CRWPCQKK	202	B2702, B2705
417-425	RWPSCQKKF	203	A24, B3801, Cw0401
418-426	WPSCQKKFA	204	B5102
419-427	PSCQKKFAR	205	A3302
420-428	SCQKKFARS	206	B8

Tabla 42

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
423-431	KKFARSDEL	207	B14, B3901, B3902, Cw0301, Cw0602
424-432	KFARSDELV	208	Cw0401
425-433	FARSDELVR	209	A68.1, A1101, A3101, A3302
426-434	ARSDLVRH	210	B2702, B2705
427-435	RSDELVRHH	211	A1
428-436	SDELVRHHN	212	B3701
429-437	DELVRHHNM	213	B14, B40, B60, B61, B3701, B4403, Cw0301

Tabla 43

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
432-440	VRHHNMHQR	214	B2705
433-441	RHHNMHQRN	215	B3801
434-442	HHNMHQRNM	216	B3901
436-444	NMHQRNMTK	217	A3, A1101, A3101
437-445	MHQRNMTKL	218	B14, B3701, B3901, B3902, Cw0301
439-447	QRNMTKLQL	220	B14, B2702, B2705, B3901, Cw0602
440-448	RNMTKLQLA	221	B61

Tabla 44

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
441-449	NMTKLQLAL	222	A0201, A0205, A24, A3, B7, B3902, Cw0602

5 Los ejemplos del "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" incluyen un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

10 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
 CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3),
 ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
 SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
 RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7), y

15 un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL, más preferiblemente un péptido de cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7.

20 El "péptido que comprende una secuencia de aminoácidos" significa, como es habitual, un péptido en donde se añade un aminoácido adicional al aminoácido N-terminal y/o al aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos. Cuando se añade el "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" en el "péptido antigénico canceroso A" y el "péptido antigénico canceroso B", es preferible un péptido con adición al lado C-terminal. Cuando se añade el "epítipo de WT1 restringido al MHC de clase I", es preferible la adición al lado C-terminal.

25 El "péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos, y que tiene una actividad de inducción de CTL" en la presente descripción también se denomina "péptido destructor alterado". El péptido destructor alterado significa un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen y/o añaden de 1 a 3 aminoácidos y se une a MHC de clase I para inducir CTL. La posición de sustitución del aminoácido sustituido incluye la posición 1^a (extremo N-terminal), la 2^a posición, la 3^a posición o la 9^a posición para un péptido que consiste en 9 residuos de aminoácido. El número de aminoácidos que se deben añadir (incluyendo también la inserción) es preferiblemente 1 o 2, más preferiblemente 1. Una posición de adición preferible es el extremo C-terminal. El número de aminoácidos que se deben suprimir es preferiblemente 1. En la alteración, el aminoácido que se debe añadir o el aminoácido que se debe sustituir puede ser un aminoácido no natural distinto de los 20 tipos de aminoácidos codificados por el gen.

35 Se sabe que la secuencia de aminoácidos de un péptido que se puede unir al antígeno HLA tiene regularidad (motivo de unión) para cada polimorfismo del subtipo de HLA. Por ejemplo, como motivo de unión de HLA-A24, se conoce un péptido que consiste en 8-11 residuos de aminoácido, en donde el aminoácido de la 2^a posición es Tyr, Phe, Met o Trp, y el aminoácido C-terminal es Phe, Leu, Ile, Trp o Met (J. Immunol., 152, pág. 3913, 1994, J. Immunol., 155, pág. 4307, 1994, Immunogenetics, 41, pág. 178, 1995). Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de un péptido que consiste en 9 residuos de aminoácido, la 2^a posición puede ser sustituida con Tyr, Phe, Met o Trp y/o la 9^a posición puede ser sustituida con Phe, Leu, Ile, Trp o Met, y un péptido que tiene tales sustituciones es preferible como un péptido destructor alterado. De forma similar, un péptido que consiste en 8 - 11 residuos de aminoácido, en donde el aminoácido de la 2^a posición es Leu o Met y el aminoácido C-terminal es Val o Leu, se conoce como un motivo de unión de HLA-A0201. Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de un péptido que consiste en 9 residuos de aminoácido, la 2^a posición puede ser sustituida con Leu o Met y/o la 9^a posición puede ser sustituida con Val o Leu, y se prefiere un péptido que tiene tales sustituciones como un péptido destructor alterado.

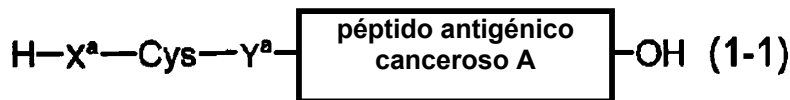
Los ejemplos del péptido destructor alterado incluyen los siguientes péptidos.

5 RYFPNAPYL (SEQ ID NO: 223) (véase el documento WO03/106682),
 FMFPNAPYL (SEQ ID NO: 224),
 RLFPNAPYL (SEQ ID NO: 225),
 RMMPNAPYL (SEQ ID NO: 226),
 RMFPNAPYV (SEQ ID NO: 227) y
 YMFPNAPYL (SEQ ID NO: 228) (véase el documento WO2009/072610), que son péptidos destructores
 alterados de RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2);

10 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) (véase el documento WO02/79253);
 Xaa-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 229)
 (en donde Xaa es Ser o Ala) y
 Xaa-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 230)
 15 (en donde Xaa es Ser, Ala, Abu, Arg, Lys, Orn, Cit, Leu, Phe o Asn) (véase el documento WO2004/026897),
 que son péptidos destructores alterados de CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3);
 AYLPAVPSL (SEQ ID NO: 231) (véase el documento WO2003/106682), que es un péptido destructor alterado
 de ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5);
 20 FLGEQQYSV (SEQ ID NO: 232),
 SMGEQQYSV (SEQ ID NO: 233) y
 SLMEQQYSV (SEQ ID NO: 234) (WO2009/072610), que son péptidos destructores alterados de
 SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6); y
 RYPGVAPTL (SEQ ID NO: 235) (WO2003/106682), que es un péptido destructor alterado de RVPGVAPTL
 (SEQ ID NO: 7).

25 "R¹" en la presente invención es un péptido antigénico canceroso C, como se define en las reivindicaciones adjuntas.
 También se describe aquí que "R¹" es un átomo de hidrógeno, o un grupo representado por la fórmula (2)
 mencionada anteriormente, preferiblemente un grupo representado por la fórmula (2) mencionada anteriormente.

30 Cuando R¹ es un átomo de hidrógeno, el compuesto de fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (1-1):



35 en donde X^a, Y^a y el péptido antigénico canceroso A se definen como antes para la fórmula (1), y Cys es un residuo
 de cisteína, a saber, un péptido.

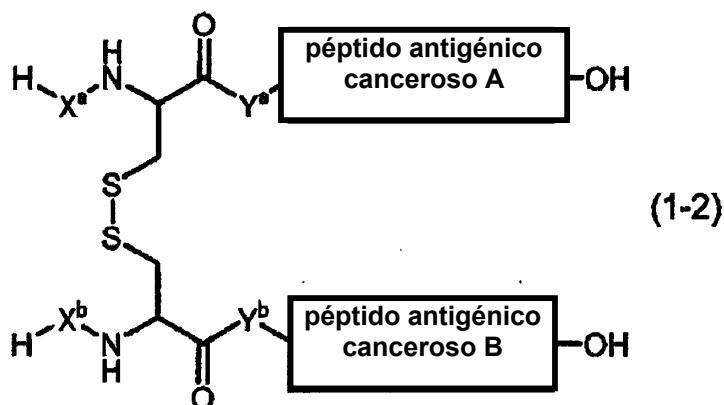
40 El compuesto de la fórmula (1), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno, a saber, un péptido representado por la
 fórmula (1-1), tiene una secuencia diferente de una secuencia parcial de la proteína WT1. El requisito de la fórmula
 (1), "tiene una secuencia diferente de una secuencia parcial de la proteína WT1" significa que un péptido
 representado por la fórmula (1-1) no es un péptido parcial que consiste en 8 - 35 residuos de aminoácido continuos
 en la secuencia de aminoácidos de WT1 humana descrita en SEQ ID NO: 1.

45 Es decir, el compuesto de la fórmula (1), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno, no es un péptido parcial que
 consiste en 8 - 35 residuos de aminoácido continuos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano descrita en
 SEQ ID NO: 1. Se proporciona una explicación específica tomando un caso en el que el péptido antigénico
 canceroso A es un péptido WT1₁₃₈₋₁₄₆ como ejemplo. El péptido WT1₁₃₈₋₁₄₆ es un péptido parcial que consiste en 9
 residuos de aminoácido continuos en la posición 138^a - posición 146^a de la secuencia de aminoácidos de WT1
 humana descrita en SEQ ID NO: 1, y tiene una secuencia de aminoácidos de LESQPAIRN (SEQ ID NO: 78). En
 50 SEQ ID NO: 1, la posición 137^a que continúa desde el lado N-terminal del péptido WT1₁₃₈₋₁₄₆ es C. Por lo tanto, el
 péptido WT1₁₃₇₋₁₄₆ (CLESQPAIRN) (SEQ ID NO: 236) corresponde a un péptido parcial que consiste en 10 residuos
 de aminoácido continuos de la secuencia de aminoácidos de WT1 humana descrita en SEQ ID NO: 1. Por otro lado,
 basándose en el requisito "el compuesto de la fórmula (1), en donde R¹ es un átomo de hidrógeno, no es un péptido
 parcial que consiste en 8 - 35 residuos de aminoácido continuos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humana
 55 descrito en SEQ ID NO: 1", en el compuesto de fórmula (1) en donde R¹ es un átomo de hidrógeno, cuando el
 péptido antigénico A es el péptido WT1₁₃₈₋₁₄₆ (LESQPAIRN) (SEQ ID NO: 78), el péptido WT1₁₃₇₋₁₄₆ (CLESQPAIRN)
 (SEQ ID NO: 236) se excluye del compuesto de la presente descripción, y por lo tanto, X^a e Y^a no son
 simultáneamente un enlace sencillo.

60 Como compuesto de la fórmula (1) en donde R¹ es un átomo de hidrógeno, se prefiere un péptido que consiste en
 cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

5 CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13),
 CCMTWNQMNL (SEQ ID NO: 14),
 CCYTWNQMNL (SEQ ID NO: 15),
 CALLPAVPSL (SEQ ID NO: 16),
 CSLGEQQYSV (SEQ ID NO: 17) y
 CRVPGVAPTL (SEQ ID NO: 18).

10 Cuando "R"¹ es un grupo representado por la fórmula (2) mencionada anteriormente, un compuesto de fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (1-2):



15 en donde X^aY^a y el péptido antigénico canceroso A se definen como antes para la fórmula (1), y X^bY^b y el péptido antigénico canceroso B se definen como antes para la fórmula (2).

20 "X^b" e "Y^b" en la presente descripción significan, independientemente, un enlace sencillo o un grupo divalente de péptidos que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido. La suma del número de residuos de aminoácido de X^b y el de Y^b es un número entero de 0 a 4. Por ejemplo, que un número entero de dicha suma es 0 significa que X^b e Y^b son cada uno un enlace sencillo. Cuando la suma es un número entero de 4, los ejemplos de los mismos incluyen que X^b e Y^b sean independientemente grupos divalentes de péptido que consisten en 2 residuos de aminoácido, que X^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 3 residuos de aminoácido que Y^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido, que X^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 4 residuos de aminoácido que Y^b sea un enlace sencillo y similares.

25 El número entero de dicha suma es preferiblemente 0-2, más preferiblemente 0-1, lo más preferiblemente 0. Es decir, X^b e Y^b son más preferiblemente enlaces sencillos.

30 Cuando la suma es un número entero de 2, los ejemplos de los mismos incluyen que X^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 2 residuos de aminoácido que Y^b sea un enlace sencillo, que X^b e Y^b sean independientemente grupos de péptidos divalentes que consisten en 1 residuo de aminoácido y que X^b sea un enlace sencillo y que Y^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 2 residuos de aminoácido.

35 Cuando la suma es un número entero de 1, los ejemplos de los mismos incluyen que X^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido y que Y^b sea un enlace sencillo, y que X^b sea un enlace sencillo y que Y^b sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido. De estos, se prefiere que X^b sea un enlace sencillo y que Y^b sea un residuo de alanina, residuos de leucina o residuo de metionina.

40 El "péptido antigénico canceroso B" en la presente descripción es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido. El "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" se define como antes. Sin embargo, en el compuesto representado por la fórmula (1), el péptido antigénico canceroso A y el péptido antigénico canceroso B no son simultáneamente el mismo péptido. Es decir, el péptido antigénico canceroso B está limitado por el requisito, "diferente del péptido antigénico canceroso A".

45 Dado que el péptido antigénico canceroso A y el péptido antigénico canceroso B no son simultáneamente el mismo péptido, el compuesto de la fórmula (1), en donde R¹ es un grupo representado por la fórmula mencionada anteriormente (2), no es un homodímero sino un heterodímero, incluso cuando X^a y X^b son iguales e Y^a e Y^b son iguales. Homodímero significa un dímero en el que los mismos monómeros peptídicos son dimerizados, y heterodímero significa un dímero en el que diferentes monómeros peptídicos son dimerizados.

En el péptido B del antígeno canceroso, el grupo amino del aminoácido N-terminal está unido a Y^b en la fórmula (2) (es decir, también unido a Y^b en la fórmula (1-2)), y el grupo carbonilo del aminoácido C-terminal está unido al grupo hidroxilo en la fórmula (2).

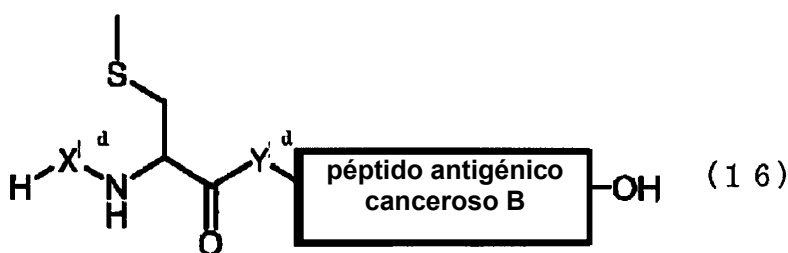
- 5 Como compuesto de la fórmula (1) en donde R^1 es un grupo representado por la fórmula (2), es decir, un compuesto de la fórmula (1-2), se prefiere un compuesto representado por la fórmula (3):



- 10 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

En la presente descripción, además, cuando el "péptido antigénico canceroso B" es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que contiene un residuo de cisteína, el compuesto de fórmula (1) puede ser un compuesto en donde el grupo tioéter en el péptido antigénico canceroso B está unido a un grupo tioéter en la fórmula (16):

15



o a un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso E.

- 20 " X^d " e " Y^d " en la presente descripción significan, independientemente, un enlace sencillo o un grupo divalente de péptidos que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido. La suma del número de residuos de aminoácido de X^d y la de Y^d es un número entero de 0 a 4. Por ejemplo, que un número entero de dicha suma es 0 significa que X^d e Y^d son cada uno un enlace sencillo. Cuando la suma es un número entero de 4, los ejemplos de los mismos incluyen que X^d e Y^d sean independientemente grupos divalentes de péptido que consisten en 2 residuos de aminoácido, que X^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 3 residuos de aminoácido y que Y^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido, que X^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 4 residuos de aminoácido que Y^d sea un enlace sencillo y similares.

- 30 El número entero de dicha suma es preferiblemente 0-2, más preferiblemente 0-1, lo más preferiblemente 0. Es decir, X^d e Y^d son más preferiblemente enlaces sencillos.

- 35 Cuando la suma es un número entero de 2, los ejemplos de los mismos incluyen que X^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 2 residuos de aminoácido y que Y^d sea un enlace sencillo, que X^d e Y^d sean independientemente grupos de péptidos divalentes que consisten en 1 residuo de aminoácido o que X^d sea un enlace sencillo y que Y^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 2 residuos de aminoácido.

- 40 Cuando la suma es un número entero de 1, los ejemplos de los mismos incluyen que X^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido y que Y^d sea un enlace sencillo, y que X^d sea un enlace sencillo y que Y^d sea un grupo divalente de péptido que consiste en 1 residuo de aminoácido. De estos, se prefiere que X^d sea un enlace sencillo y que Y^d sea un residuo de alanina, residuos de leucina o residuo de metionina.

- 45 El "péptido antigénico canceroso D" en la presente descripción es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido. En la fórmula (16), un grupo amino del aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso D se une a Y^d en la fórmula (16), y un grupo carbonilo del aminoácido C-terminal se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (16).

- Según se utiliza en la presente memoria, el término "restringido al MHC de clase II" significa la propiedad de inducir células T auxiliares mediante la unión a una molécula de MHC de clase II, y se define como para el "péptido antigénico canceroso C" mencionado más adelante.

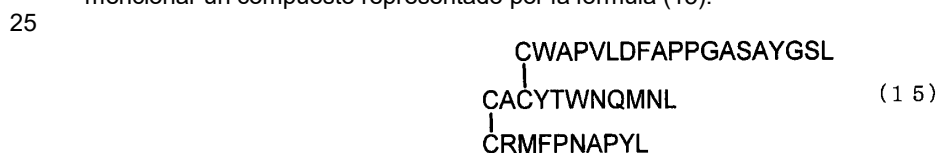
- 50 El HLA correspondiente a la molécula de MHC de clase II se clasifica en subtipos de HLA-DR, DQ y DP y similares. Los ejemplos preferidos del "restringido al MHC de clase II" incluyen restringido a HLA-DR, restringido a HLA-DQ y restringido a HLA-DP.

Por lo tanto, el "péptido WT1 restringido al MHC de clase II" en la presente descripción es un péptido que se une a un antígeno de MHC de clase II in vitro y/o in vivo e induce células T auxiliares. El número de residuos de aminoácido del "péptido WT1 restringido al MHC de clase II" es 7 - 30, preferiblemente 14 - 30.

5 En cuanto al "péptido antigénico canceroso D", como secuencia de aminoácidos indicada en el "péptido antigénico canceroso C" mencionado más adelante, se puede mencionar un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

10 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 15 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) y
 20 WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

En el compuesto de la fórmula (1), además, cuando el "péptido antigénico canceroso B" es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que contiene un residuo de cisteína, como un compuesto en donde el grupo tioéter en el péptido antigénico canceroso B está unido a un grupo tioéter en la fórmula (16), preferiblemente, se puede mencionar un compuesto representado por la fórmula (15):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

30 En la presente descripción, el "péptido antigénico canceroso E" es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína, y se define como para el péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína "en el péptido antigénico canceroso C" mencionado más adelante.

35 En cuanto al "péptido antigénico canceroso E", como secuencia de aminoácidos citada en el "péptido antigénico canceroso C" mencionado más adelante, se puede mencionar un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

40 SGQARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 19),
 SGQAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO: 25),
 SGQARMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 11),
 SGQAYMFPNAPYLPSCLES (SEQ ID NO: 12),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
 45 PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),
 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24).

50 Como se define en las reivindicaciones adjuntas, R¹ es el péptido antigénico canceroso C, y el grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso C está unido al grupo tioéter en la fórmula (1).

El péptido antigénico canceroso C es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

55 CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4).

60 También se describe en la presente memoria un péptido antigénico canceroso C que es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína o un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contienen uno residuo de

cisteína.

5 En el "péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína" en la presente descripción, solo se necesita que la secuencia de aminoácidos del péptido contenga al menos un residuo de cisteína. El número de residuos de cisteína que debe contenerse es preferiblemente 1 - 3, más preferiblemente 1 - 2, lo más preferiblemente 1. El "péptido WT1 restringido al MHC de clase I" se define como antes. Asimismo, el compuesto de la fórmula (1) en donde R¹ es "un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína" no es un homodímero sino un heterodímero.

10 Los ejemplos del "péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína" incluyen péptidos descritos en las Tablas 45 - 52. En cada Tabla, la "posición" significa la posición en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano descrito en SEQ ID NO: 1.

Tabla 45

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
17-25	SLGGGGGCA	31	B62
18-26	LGGGGGCAL	32	B60, B7, B3801, B5101, B5102
20-28	GGGGCALPV	33	B61, B5101, B5102, B5201
23-31	GCALPVSGA	34	B40, B61
24-32	CALPVSGAA	35	B40, B5102, Cw0301

15

Tabla 46

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
80-88	GAEPHEEQC	51	A1
81-89	AEPHEEQCL	52	A0205, B40, B60, B61, B3701, B4403
82-90	EPHEEQCLS	53	B3501, B5101
83-91	PHEEQCLSA	54	B3801
84-92	HEEQCLSAF	55	B40, B3701, B4403, Cw0702
85-93	EEQCLSAFT	56	B40, B60, B61, B3701, B4403
86-94	EQCLSAFTV	57	A0201, B62, B5201
88-96	CLSAFTVHF	58	A3, B62
99-107	QFTGTAGAC	63	Cw0401
100-108	FTGTAGACR	64	A68.1, A1101, A3101, A3302

Tabla 47

posición	secuencia aminoácidos	de	Núm. secuencia	de	Subtipo de HLA
101-109	TGTAGACRY		65		B62, B4403, Cw0702
104-112	AGACRYGPF		66		B4403, B5201
107-115	CRYGPFGPP		67		B2702
130-138	NAPYLPSCCL		75		A24, B60, B7, B8, B3902, B5101, B5102, Cw0301, Cw0602, Cw0702
136-144	SCLESQPAI		76		B8, B3901, B5102, Cw0301
137-145	CLESQPAIR		77		A1, A3, A68.1, A1101, A3101, A3302
194-202	SVPPPYYGC		97		A0205, A3

ES 2 691 091 T3

Tabla 48

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
202-210	CHPTDSCT	98	B3801
204-212	TPTDSCTGS	99	B5101
206-214	TDSTGSQA	100	B40, B61, B3701
207-215	DSCTGSQAL	101	A24, A3302, B60, B7, B8, B3501, B3901, B3902, Cw0602
208-216	SCTGSQALL	102	B60, B7, B8, B3701, B3801, B3901, B3902
209-217	CTGSQALLL	103	B60, B7, B3701, B3902
227-235	YQMTSQLEEC	114	A0201, A0205, B62
228-236	QMTSQLECM	115	A0201

Tabla 49

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
230-238	TSQLECMTW	116	B5801
232-240	QLECMTWNQ	117	A1
233-241	LECMTWNQM	118	B40, B60, B61, B3701, B4403
235-243	CMTWNQMNL	3	A0201, A0205, A24, A3, B7
276-284	HTTPILCGA	134	B5801
278-286	TPILCGAQY	135	B3501, B4403, Cw0401, Cw0702
279-287	PILCGAQYR	136	A3101
280-288	ILCGAQYRI	137	A0201, A0205, A3, B62, B5101

Tabla 50

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
317-325	TSEKRPFMC	156	A1, B5801
318-326	SEKRPFMCA	157	B40, B60, B61, B4403
319-327	EKRPFMCAY	158	Cw0602, Cw0702
324-332	MCAYPGCNK	159	A68.1, A1101
325-333	CAYPGCNKR	160	A1, A68.1, A1101, A3101, A3302
326-334	AYPGCNKRY	161	A24, Cw0401, Cw0702
327-335	YPGCNKRYF	162	B3501, B3801, B5201, Cw0401, Cw0702
329-337	GCNKRYFKL	163	A24, B14, B60, B7, B8, B3902, Cw0301
347-355	HTGEKPYQC	170	B8, B5801
349-357	GEKPYQCDF	171	B40, B3701, B4403

Tabla 51

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
351-359	KPYQCDFKD	172	B5102
354-362	QCDFKDCER	173	A1, A68.1, A3101, A3302
356-364	DFKDCERRF	174	A24, Cw0401
358-366	KDCERRFSR	175	A3101
379-387	GVKPFQCKT	185	A68.1

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
383-391	FQCKTCQRK	186	A3, A1101, A3101, B2705
384-392	QCKTCQRFK	187	B62, B8
386-394	KTCQRKFSR	188	A1, A3, A68.1, A1101, A3101
387-395	TCQRKFSRS	189	B8

Tabla 52

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	Subtipo de HLA
408-416	KTSEKPFSC	197	A0201, B5801
409-417	TSEKPFSCR	198	A1, A68.1, A3302
410-418	SEKPFSCRW	199	B40, B4403
412-420	KPFSCRWPS	200	B3501, B5102
415-423	SCRWPSCQK	201	A1101
416-424	CRWPSCQKK	202	B2702 B2705
417-425	RWPSCQKKF	203	A24, B3801, Cw0401
418-426	WPSCQKKFA	204	B5102
419-427	PSCQKKFAR	205	A3302
420-428	SCQKKFARS	206	B8

Otros ejemplos del "péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína" incluyen un péptido que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3)

y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de CTL. Dichos "que contiene la secuencia de aminoácidos" y

10 "péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido en una secuencia de aminoácidos, y que tiene una actividad de inducción de CTL" se definen como antes.

En cuanto al compuesto de la fórmula (1) en donde R¹ es "un péptido WT1 restringido al MHC de clase I que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína", son preferibles un compuesto representado por la fórmula (4):

15



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o un compuesto representado por la fórmula (5):

20

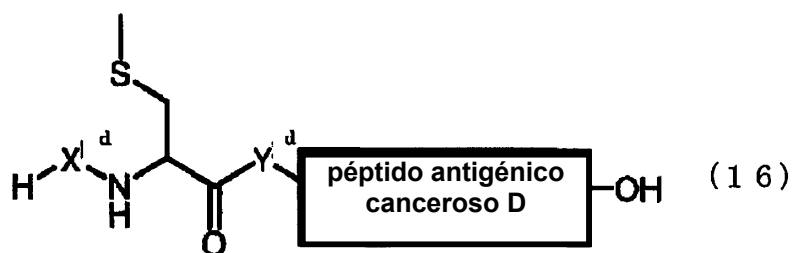


en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro. De estos, es más preferible un compuesto representado por la fórmula (5).

25

También se describe en la presente memoria que, cuando un péptido que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína se une adicionalmente al extremo N-terminal del "péptido antigénico C" que es un péptido WT1 restringido a clase I de MHC, el compuesto de la fórmula (1) puede ser un compuesto en donde el grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido unido al extremo N-terminal del péptido antigénico canceroso C está unido a un grupo tioéter en la fórmula (16):

30

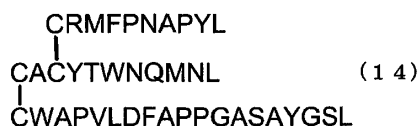


o a un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso E.

5 "X^d", "Y^d", "péptido antigénico canceroso D" y "péptido antigénico canceroso E" en la presente descripción son los definidos para "X^d", "Y^d", "péptido antigénico canceroso D" y "péptido antigénico canceroso E" antes mencionados.

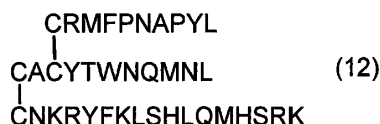
10 En la presente descripción, el péptido que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína, que está unido al N-terminal del "péptido C antígeno canceroso" que es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I, es preferiblemente un dipéptido que consiste en CA.

15 En el compuesto de la fórmula (1), cuando un péptido que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína se une adicionalmente al extremo N-terminal del "péptido antigénico canceroso C" que es un WT1 de clase I restringido al MHC péptido, el compuesto en donde el grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido unido al extremo N-terminal del péptido antigénico C se une a un grupo tioéter en la fórmula (16) es preferiblemente un compuesto representado por la fórmula (14):



20 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

25 Además, en el compuesto de fórmula (1), cuando un péptido que consiste en 1 - 4 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína se une además al extremo N-terminal del "péptido antigénico C", que es un péptido WT1 restringido al MHC de clase I, el compuesto en donde el grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido unido al extremo N-terminal del péptido C antígeno canceroso está unido a un grupo tioéter en el "péptido E del antígeno canceroso" es preferiblemente un compuesto representado por la fórmula (12):



30 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

35 En el "péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína" en la presente descripción, solo se necesita que la secuencia de aminoácidos del péptido contenga al menos un residuo de cisteína. El número de residuos de cisteína que debe contenerse es preferiblemente 1 - 3, más preferiblemente 1 - 2, lo más preferiblemente 1.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "restringido al MHC de clase II" significa la propiedad de inducir células T auxiliares uniéndose a una molécula del MHC de clase II.

40 El HLA correspondiente a la molécula del MHC de clase II se clasifica en subtipos de HLA-DR, DQ y DP y similares. Los ejemplos preferidos del "restringido al MHC de clase II" incluyen restringido a HLA-DR, restringido a HLA-DQ y restringido a HLA-DP.

45 Por lo tanto, el "péptido WT1 restringido al MHC de clase II" es un péptido que se une a un antígeno del MHC de clase II in vitro y/o in vivo e induce células T auxiliares. El número de residuos de aminoácido del "péptido WT1 restringido al MHC de clase II" es 7 - 30, preferiblemente 14 - 30.

Los ejemplos del "péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína" incluyen los péptidos descritos en la Tabla 53. En cada Tabla, la "posición" significa

una posición en la secuencia de aminoácidos de WT1 humana descrito en SEQ ID NO: 1.

Tabla 53

posición	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia
117-139	PSQASSGQARMFPNAPYLPSCLE	237
122-140	SGQARMFPNAPYLPSICLES	11
202-233	CHTPTDSC TGSQALLRTPYSSDNLYQMTSQL	9
328-349	PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	10
421-441	CQKKFARSDELVRHHNMHQRN	219

5 En cuanto al "péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína", se prefiere un péptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGQARMFPNAPYLPSICLES (SEQ ID NO: 11) y
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

10 o
un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada, que es cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 10 - 11 pero que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de inducción de células T auxiliares.

15 El "péptido que comprende una secuencia de aminoácidos" significa, como se menciona anteriormente, un péptido en la presente descripción también se denomina "péptido auxiliar alterado". El péptido auxiliar alterado significa un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen y/o añaden de 1 a 3 aminoácidos y se une a MHC de clase II para inducir células T auxiliares. El número de aminoácidos que se añadirán (incluyendo también la inserción) es preferiblemente de 1 a 3. El número de aminoácidos que se debe suprimir es preferiblemente de 1 a 5. En la alteración, el aminoácido que se va a añadir o el aminoácido que se debe sustituir puede ser un aminoácido no natural distinto de los 20 tipos de aminoácidos codificados por el gen.

20 El "péptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada que contiene la alteración de uno o varios residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos, y que tiene actividad de inducción de células T auxiliares" en la presente descripción también se denomina "péptido auxiliar alterado". El péptido auxiliar alterado significa un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se suprimen, sustituyen y/o añaden de 1 a 3 aminoácidos y se une a MHC de clase II para inducir células T auxiliares. El número de aminoácidos que se añadirán (incluyendo también la inserción) es preferiblemente de 1 a 3. El número de aminoácidos que se debe suprimir es preferiblemente de 1 a 5. En la alteración, el aminoácido que se va a añadir o el aminoácido que se debe sustituir puede ser un aminoácido no natural distinto de los 20 tipos de aminoácidos codificados por el gen.

30 En cuanto al péptido auxiliar alterado, por ejemplo, se pueden mencionar los siguientes péptidos:

SGQAYMFPNAPYLPSICLES (SEQ ID NO: 12) (véase el documento relacionado con patente 6),
SGQARMFPNAPYLPSIC (SEQ ID NO: 19) y
35 SGQAYMFPNAPYLPSIC (SEQ ID NO: 25), que son péptidos auxiliares alterados de
SGQARMFPNAPYLPSICLES (SEQ ID NO: 11); y
GCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
40 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24), que son péptidos auxiliares alterados de
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10).

45 En cuanto al "péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína", se prefiere un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

50 SGQARMFPNAPYLPSIC (SEQ ID NO: 19),
SGQAYMFPNAPYLPSIC (SEQ ID NO: 25),
SGQARMFPNAPYLPSICLES (SEQ ID NO: 11),
SGQAYMFPNAPYLPSICLES (SEQ ID NO: 12),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 20),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 21),
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 10),

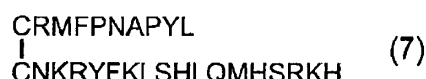
CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) y
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24).

- 5 En cuanto al compuesto de la fórmula (1) en donde R¹ es "un péptido WT1 restringido al MHC de clase II que consiste en 7 - 30 residuos de aminoácido que contiene un residuo de cisteína", se prefieren un compuesto representado por la fórmula (6):



10

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (7):



15

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, un compuesto representado por la fórmula (8):



20

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un compuesto representado por la fórmula (9):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

- 25 La presente invención también proporciona una composición que comprende el compuesto de la presente invención y uno o más péptidos WT1 restringidos al MHC de clase II.

Los ejemplos del compuesto de la presente invención que debe estar contenido en la composición de la presente invención incluyen

- 30 un compuesto representado por la fórmula (4):



35

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y un compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

- 40 Otros ejemplos descritos del compuesto de la presente descripción que debe estar contenido en la composición de la presente descripción incluyen un compuesto representado por la fórmula (3):



45

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

Los ejemplos del péptido WT1 restringido al MHC de clase II que está contenido en la composición de la presente invención incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 50 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),

CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

5 También se describe en la presente memoria un método de síntesis de un compuesto en el que dos péptidos WT1 restringidos al MHC de clase I y péptidos WT1 restringidos al MHC de clase II, o dos epítomos de WT1 restringidos al MHC de clase I y epítomos de WT1 restringidos al MHC de clase II están unidos cada uno a través de un enlace disulfuro. El método incluye los siguientes pasos (1) - (3).

10 En la etapa (1) de la presente descripción, se sintetiza un péptido en donde un grupo carbonilo del aminoácido C-terminal de C(Mmt)A y el grupo amino N-terminal del péptido C antígeno canceroso se fusiona utilizando Fmoc-C(Mmt)A-SBn y péptido antigénico canceroso C.

15 El "péptido antigénico canceroso C" se define como para el "péptido antigénico canceroso C" antes mencionado. "Fmoc" es un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo. "Mmt" es un grupo monometoxitritilo. "SBn" es un grupo tiobencilo.

20 En la etapa (2) de la presente descripción, se sintetiza un péptido en donde se unen un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico C en el péptido obtenido en la etapa (1) mencionada anteriormente y un grupo tioéter del residuo de cisteína unido al N-terminal del péptido antigénico canceroso A mediante el uso del péptido obtenido en la etapa (1) mencionada anteriormente y del péptido antigénico canceroso A, en donde un residuo de cisteína protegido por el grupo Npys se une al extremo N-terminal.

25 El "péptido antigénico canceroso A" se define como para el "péptido antigénico canceroso A" antes mencionado. "Npys" es un grupo 3-nitro-2-piridiltio.

30 En la etapa (3) de la presente descripción, se sintetiza un péptido en donde se unen un grupo tioéter del residuo de cisteína se une al N-terminal del péptido A antigénico del cáncer en el péptido obtenido en la etapa (2) mencionada anteriormente, y un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico canceroso D, utilizando el péptido obtenido en la etapa (2) mencionada anteriormente y el péptido antigénico canceroso D que contiene un residuo de cisteína protegido por el grupo Spy.

35 El "péptido antigénico canceroso D" se define como para el "péptido antigénico canceroso D" mencionado anteriormente. "SPy" es un grupo 2-piridilsulfuro.

40 El compuesto de la presente invención y el péptido descrito en la presente memoria, y los péptidos que pueden ser intermedios del mismo pueden producirse de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva o un método que se utiliza generalmente para la síntesis de péptidos. Los ejemplos del método de producción incluyen los métodos descritos en los documentos (Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Experiment of Peptide Synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product subsequent vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten, 1991) y similares.

45 Los ejemplos de los mismos incluyen un método de producción mediante un sintetizador en fase sólida utilizando el método Fmoc o Boc y un método de producción por condensación secuencial de Boc-aminoácido o Z-aminoácido por medio de un procedimiento de síntesis en fase líquida (Fmoc es un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo, Boc es un grupo t-butoxicarbonilo, y Z es un grupo benciloxicarbonilo).

50 En el intermedio para la producción del compuesto de la presente invención, un grupo funcional tal como un grupo amino, un grupo carboxi, un grupo mercapto y similares pueden protegerse mediante un grupo protector adecuado o desprotegerse según sea necesario utilizando técnicas de protección y desprotección. En cuanto a los grupos protectores preferibles, el método de protección y el método de desprotección se describen en detalle en "Protective Groups in Organic Synthesis, segunda edición (John Wiley & Sons, Inc.; 1990) y similares. Los ejemplos del grupo protector de mercapto incluyen un grupo acetamidometilo, un grupo tritilo y similares.

55 Cuando el compuesto de la presente invención tiene un enlace disulfuro, el enlace disulfuro se puede formar entre dos péptidos diferentes que contienen un residuo de cisteína o entre un péptido que contiene un residuo de cisteína y cisteína de acuerdo con un método generalmente utilizado para la química de péptidos. Los ejemplos del método de formación del enlace disulfuro incluyen los métodos descritos en los documentos (Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Basics and Experiment of peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product sequential vol. vol. 14, Síntesis de péptidos, Hirokawa Shoten, 1991) y similares.

60 Específicamente, cuando un péptido contiene un residuo de cisteína, se puede producir un compuesto que tiene un enlace disulfuro (compuesto disulfuro) mediante eliminación de todos los grupos protectores incluyendo el grupo protector de mercapto en la cadena lateral de cisteína y oxidación en un disolvente inerte. Además, se puede

producir mezclando dos compuestos intermedios que tienen un grupo mercapto en un disolvente adecuado para permitir la oxidación. En cuanto al método para la oxidación, se puede seleccionar un método conocido para formar un enlace disulfuro en síntesis peptídica general según sea apropiado. Por ejemplo, se puede mencionar la oxidación con yodo, un método que incluye la reacción de oxidación con aire bajo condiciones alcalinas, un método para formar un enlace disulfuro mediante la adición de un oxidante en condiciones ácidas o alcalinas y similares. Aquí, como oxidante, se pueden mencionar yodo, dimetilsulfóxido (DMSO), ferricianuro de potasio y similares. Como disolvente, se pueden utilizar agua, ácido acético, metanol, cloroformo, DMF, DMSO y similares, o una mezcla de los mismos. Una reacción de oxidación a menudo proporciona una mezcla de compuestos disulfuro simétricos, asimétricos. El compuesto disulfuro asimétrico objeto se puede obtener por purificación mediante diversas cromatografías, recristalización y similares. Alternativamente, un intermedio que tiene un grupo mercapto activado y un intermedio que tiene un grupo mercapto se mezclan para formar un enlace disulfuro selectivo. En cuanto al intermedio que tiene un grupo mercapto activado, se puede mencionar un grupo mercapto unido con un grupo Npys (grupo 3-nitro-2-piridinsulfenilo) y similares. Alternativamente, se mezclan previamente un intermedio y, por ejemplo, 2,2'-ditiobis (5-nitropiridina) para activar el grupo mercapto, y a continuación se añade el otro intermedio, con lo que se puede formar un enlace disulfuro selectivo (Tetrahedron Letters. Vol. 37. Núm. 9, pág. 1347-1350).

Además, cuando están contenidos en el péptido dos o más residuos de cisteína, se puede utilizar un método similar al método mencionado anteriormente. En este caso, se obtiene un isómero con una forma diferente de enlace disulfuro. Se puede obtener un dímero en el que se forma un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína objeto utilizando una combinación concreta de los grupos protectores de la cadena lateral de la cisteína. En cuanto a la combinación mencionada anteriormente de grupos protectores, se pueden mencionar el grupo MeBzl (metilbencilo) y el grupo Acm (acetamidometilo), el grupo Trt (trilito) y el grupo Acm, el grupo Npys (3-nitro-2-piridilitio) y el grupo Acm, el grupo S-Bu-t (S-terc-butilo) y el grupo Acm y similares. Por ejemplo, en el caso de una combinación del grupo MeBzl y el grupo Acm, se puede mencionar un método para formar un enlace disulfuro entre grupos cisteína protegidos por Acm, que incluye la eliminación del grupo protector distinto del grupo MeBzl y la cadena lateral de cisteína, sometiendo una solución que contiene un monómero de péptido a reacción de oxidación con aire para formar un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína desprotegidos, y a continuación realizando la desprotección con yodo y oxidación y similares.

El compuesto, péptido e intermedio obtenidos se pueden purificar de acuerdo con un método conocido por los expertos en la técnica y un método generalmente utilizado para química de péptidos. Por ejemplo, se pueden purificar mediante diversas cromatografías (p.ej., cromatografía en columna de gel de sílice, cromatografía en columna de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de fase inversa), recristalización y similares. Por ejemplo, como disolvente de recristalización, se pueden utilizar disolventes alcohólicos tales como metanol, etanol, 2-propanol y similares, disolventes etéricos tales como éter dietílico y similares, ésteres disolventes tales como acetato de etilo y similares, disolventes hidrocarbonados aromáticos tales como benceno, tolueno y similares, disolventes cetónicos tales como acetona y similares, disolventes hidrocarbonados tales como hexano y similares, disolventes apróticos tales como dimetilformamida, acetonitrilo y similares, agua, una mezcla disolvente de los mismos y similares. En cuanto a otros métodos de purificación, se pueden utilizar los métodos descritos en Jikken Kagaku Kouza (The Chemical Society of Japan ed., Maruzen) vol. 1 etc., y similares.

Los métodos de purificación del compuesto disulfuro se describen en los documentos (Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Basics and Experiment of Peptide Synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product sequential vol. 14-peptide synthesis, Hirokawa Shoten, 1991) y similares. Entre estos, se prefiere la HPLC.

Cuando el compuesto de la presente invención tiene uno o más puntos asimétricos, éste se puede producir de acuerdo con un método general y utilizando una sustancia de partida que tenga los puntos asimétricos (aminoácido). Para aumentar la pureza óptica del compuesto de la presente invención, además, la resolución óptica y similares se pueden realizar en una etapa adecuada de la etapa de producción. En cuanto al método de resolución óptica se puede utilizar, por ejemplo, un método de diastereómeros que incluye formar una sal del compuesto de la presente invención o un intermedio del mismo con un ácido ópticamente activo (p.ej., ácidos monocarboxílicos tales como ácido mandélico, N-benciloxianina, ácido láctico y similares, ácidos dicarboxílicos tales como ácido tartárico, ácido o-diisopropilidentartárico, ácido málico y similares, o ácidos sulfónicos tales como ácido canforsulfónico, ácido bromocanfósulfónico y similares) en un disolvente inerte (p.ej., disolventes alcohólicos tales como metanol, etanol, 2-propanol y similares, disolventes etéricos tales como éter dietílico y similares, ésteres disolventes tales como acetato de etilo y similares, disolventes hidrocarbonados tales como tolueno y similares, disolventes apróticos tales como acetonitrilo y similares, y una mezcla disolvente de los mismos). Cuando el compuesto de la presente invención o intermedio tiene un grupo funcional ácido tal como un grupo carboxi y similares, la resolución óptica también se puede realizar formando una sal con una amina ópticamente activa (p.ej., amina orgánica tal como α -fenetilamina, quinina, quinidina, cinconidina, cinconina, estriquina y similares).

La temperatura para formar una sal se selecciona del intervalo de la temperatura ambiente al punto de ebullición del

disolvente. Para mejorar la pureza óptica, es deseable elevar la temperatura hasta aproximadamente el punto de ebullición del disolvente. Cuando la sal precipitada se recoge por filtración, ésta se puede enfriar según sea necesario para aumentar el rendimiento. Una cantidad adecuada del ácido ópticamente activo, o amina que se debe utilizar está dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 - aproximadamente 2,0 equivalentes, preferiblemente aproximadamente 1 equivalente, con respecto al sustrato. Cuando sea necesario, los cristales pueden recristalizarse en un disolvente inerte (p.ej., disolventes alcohólicos tales como metanol, etanol o 2-propanol y similares, disolventes etéricos tales como éter dietílico y similares, ésteres disolventes tales como acetato de etilo y similares, disolventes hidrocarbonados tales como tolueno y similares, disolventes apróticos tales como acetonitrilo y similares, y una mezcla disolvente de los mismos) para proporcionar también una sal ópticamente activa con alta pureza. Cuando sea necesario, la sal ópticamente resuelta se puede tratar con un ácido o base mediante un método general para proporcionar una forma libre.

Los ejemplos de la "sal farmacéuticamente aceptable" en la presente invención incluyen sal de adición de ácido y sal de adición de base. Los ejemplos de la sal de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como hidrocloruro, hidrobromuro, sulfato, hidroyoduro, nitrato, fosfato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como citrato, oxalato, acetato, formiato, propionato, benzoato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y similares. Los ejemplos de la sal de adición de base incluyen sales con bases inorgánicas tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de amonio y similares, sales con bases orgánicas tales como sal de trietilamonio, sal de trietanolamonio, sal de piridinio, sal de diisopropilamonio, etc. y similares, además, sales de aminoácidos de aminoácidos alcalinos o ácidos tales como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y similares.

La presente invención también abarca hidratos, solvatos tales como solvato de etanol y similares del compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, la presente invención abarca cualquier estereoisómero tal como cualquier diastereómero, enantiómero y similares y cualquier cristal en cualquier realización, del compuesto representado por la fórmula (1), que pueda estar presente.

En general, en la producción de péptidos, se producen diversos subproductos tales como péptidos con aminoácidos defectuosos, péptidos degradados por hidrólisis, oxidación y similares, péptidos con aminoácidos racemizados y similares en una etapa de condensación de α -aminoácido ópticamente activo, una etapa de eliminación de diversos grupos protectores, una etapa de escisión del péptido de una resina y similares. A escala de laboratorio, varias cromatografías (p.ej., cromatografía en columna de gel de sílice, cromatografía en columna de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía de fase inversa) se combinan para eliminar tales impurezas, con lo que se puede obtener péptidos y compuestos con alta pureza. Sin embargo, no es fácil obtener un péptido y un compuesto de alta pureza a escala industrial para proporcionar productos farmacéuticos.

El compuesto de la presente invención tiene propiedades fisicoquímicas para permitir la producción en masa de una sustancia farmacológica para productos farmacéuticos. Específicamente, tiene una alta solubilidad, tiene estabilidad superior en solución, es difícil de gelificar cuando se concentra y similares, y el compuesto se puede producir fácilmente como un fármaco con alta pureza a gran escala mediante un procedimiento de purificación por etapas utilizando cromatografía en columna tal como HPLC de fase inversa y similares.

El compuesto así producido de la presente invención tiene una estabilidad superior a los oxidantes y similares en solución, ya que los residuos de cisteína forman un enlace disulfuro y similares, y conserva la calidad dada como sustancia farmacológica de medicamentos y la actividad de inducción de CTL eficaz.

El compuesto de la presente invención es útil como ingrediente activo de un agente de inducción de CTL para inmunoterapia contra el cáncer, un ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer o un ingrediente activo de una composición farmacéutica. Es decir, el compuesto de la presente invención tiene, como se muestra en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva, inmunogenicidad superior y puede mostrar eficazmente una actividad de inducción de CTL superior. Además, los CTL inducidos por el compuesto de la presente invención pueden reconocer de manera sorprendente el péptido parcial de tipo natural de WT1 inherentemente presente en las células cancerosas.

La actividad de inducción de CTL puede detectarse midiendo el número de CTL mediante el método del tetrámero de HLA (Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)) o el método de dilución limitante (Nat. Med.: 4, 321-327 (1998)). Alternativamente, por ejemplo, la actividad de inducción de CTL restringida a HLA-A24 se puede examinar utilizando el modelo de ratón HLA-A24 descrito en el documento WO 02/47474 e Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002) y similares.

Por lo tanto, el compuesto de la presente invención se puede utilizarse como un fármaco terapéutico o fármaco profiláctico (fármaco preventivo de recurrencia) para el gen WT1 que expresa cáncer o el cáncer asociado con un aumento en el nivel de expresión del gen WT1. Los ejemplos del cáncer incluyen cáncer hematológico tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, linfoma maligno y similares, y tumores sólidos tales como

cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, tumor cerebral y similares.

5 El compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden ser ingredientes activos de un agente de inducción de CTL para inmunoterapia celular de cáncer, un ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer y/o un ingrediente activo de una composición farmacéutica, formulando cada compuesto o sal en una forma adecuada.

10 El compuesto de la presente invención se puede administrar junto con un portador aceptable como un medicamento tal como un coadyuvante adecuado para que su inmunidad celular se establezca de manera eficaz. En cuanto al coadyuvante, son aplicables los descritos en un documento (Clin. Microbiol. Rev., 7: 277-289, 1994) y similares. Específicamente, se pueden mencionar componentes derivados de hongos, GM-CSF, citocinas tales como interleuquina-2, interleuquina-7, interleuquina-12 y similares, componentes derivados de plantas, componentes derivados de organismos marinos, gel mineral como hidróxido de aluminio, lisolecitina, tensioactivos tales como poliol plurónico, polianión, péptido, emulsión oleosa (preparación en emulsión) y similares. En cuanto a los componentes derivados de hongos, se pueden mencionar lípido A, monofosforil lípido A, que es un derivado del mismo, bacterias muertas (bacterias Mycobacterium tales como bacterias BCG y similares), proteínas derivadas de bacterias, polinucleótidos, coadyuvante incompleto de Freund, coadyuvante completo de Freund, componentes del esqueleto de la pared celular (por ejemplo, BCG-CWS y similares), dimicolato de trehalosa (TDM) y similares.

Además, el compuesto de la presente invención también se puede administrar en forma de una preparación de liposomas, una preparación particulada que incluye la unión a esferas perlas con un diámetro de varios μm , una preparación que incluye la unión a un lípido y similares.

25 Además, el compuesto de la presente invención (producto conjugado) se puede administrar junto con un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar). En cuanto a un método para la administración conjunta, se pueden administrar individualmente un producto conjugado y un péptido auxiliar. Es más preferible una preparación combinada (agente combinado, combinación) que contiene un producto conjugado y un péptido auxiliar en una única composición farmacéutica. La preparación combinada contiene un producto conjugado capaz de producir péptido WT1 restringido al MHC de clase I (es decir, péptido destructor) y péptido WT1 restringido al MHC de clase II (es decir, péptido auxiliar). Por lo tanto, administrando la preparación combinada que contiene un péptido auxiliar, como vacuna contra el cáncer para inmunoterapia del cáncer, también se pueden activar células T auxiliares importantes para la promoción funcional de otras células T incluyendo los CTL, y se pueden mejorar la función y la eficacia (inmunocompetencia celular y similares) del producto conjugado.

El péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar) se describe como en la DESCRIPCIÓN. Los ejemplos del péptido auxiliar para la preparación combinada incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos:

40 CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
 45 WAPVLDFAPPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243). De estas, es preferible
 WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

Se podría confirmar que la preparación combinada muestra una eficacia mejorada como una vacuna contra el cáncer, tal como la inmunocompetencia celular y similares, como se muestra, por ejemplo, en los Ejemplos y los Ejemplos Experimentales en la DESCRIPCIÓN.

Si bien la dosis del compuesto de la presente invención en la preparación se puede controlar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad objeto de tratamiento, la edad y el peso corporal de los pacientes y similares, generalmente es de 0,0001 mg - 1000 mg, preferiblemente de 0,001 mg - 1000 mg, más preferiblemente, 0,1 mg - 10 mg.

En cuanto al método de administración, se pueden mencionar la administración intradérmica, la administración subcutánea, la administración intramuscular, la administración intravenosa, la administración transdérmica y similares. Son preferibles la administración intradérmica y la administración subcutánea ya que inducen de manera eficiente CTL. Aunque la frecuencia de administración y los intervalos de administración pueden controlarse apropiadamente de acuerdo con la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad objeto, y la diferencia individual en pacientes, ésta es generalmente de múltiples veces, y es preferible la administración una vez durante varios días a varios meses.

Mediante la administración de una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto de la presente invención como ingrediente activo para pacientes positivos a WT1, se puede proporcionar un método para la profilaxis o el tratamiento del cáncer.

5 Ejemplos

La presente invención se explica específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos.

10 Ejemplo 1

Síntesis del compuesto representado por la fórmula (5):



15 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

etapa 1. Síntesis de H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH

(síntesis de C(Npys)RMFPNAPYL)

20 Utilizando Fmoc-Leu-Alko-resina (Alko es alcohol p-alcoxibencílico), 282 mg (fabricado por Watanabe Chemical; 0,71 mmoles/g, 0,2 mmoles) como material de partida, la cadena peptídica se ensambló mediante síntesis en fase sólida de acuerdo con el método Fmoc/tBu. La síntesis en fase sólida se realizó utilizando el sintetizador de péptidos CS336X fabricado por CS Bio, y la desprotección del grupo Fmoc se realizó por medio de tratamiento con una
25 solución en DMF de piperidina al 20% durante 5 min y durante 20 min. El acoplamiento del aminoácido protegido se realizó mediante reacción con una solución de DMF de 1,05 mmoles de aminoácido protegido, 1 mmol de HBTU y 2 mmoles de DIPEA durante 1 hora. La resina obtenida se lavó con DMF y éter, y se secó a presión reducida para proporcionar Boc-Cys(Npys)-Arg(Pmc)-Met-Phe-Pro-Asn(Trt)-Ala-Pro-Tyr(tBu)-Leu-Alko-resina (630 mg). A esta resina peptídica se le añadió una mezcla de TFA/H₂O/TIS = 95/2,5/2,5 (10 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se separó mediante filtración, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La mezcla de reacción se enfrió con hielo y se añadió éter dietílico (50 ml). El precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con éter y se secó a presión reducida para proporcionar el péptido bruto (217 mg). La solución de péptido bruto obtenida se disolvió en una mezcla de ácido acético acuoso al 20% (7 ml) y acetronitrilo (1 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa.

35 bomba: fabricada por Shimadzu; LC-8A
columna: YMC ODS-A 3 cmφ × 25 cmL, 10 μm
eluat 1: H₂O/TFA al 0,1%
eluat 2: CH₃CN/TFA al 0,1%
40 velocidad de flujo: 20 ml/min
detección: UV220 nm

La solución de péptido bruto se inyectó en una columna equilibrada con un 15% de eluat 2. Posteriormente, la concentración del eluat 2 se elevó a 37% durante 10 min, y después se elevó a una velocidad de 0,24% por minuto.
45 Las fracciones que contenían el producto objeto se recogieron y se liofilizaron para proporcionar H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (53 mg).
espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1366,1 [M + 1]⁺
(Calculado = 1366,6)

50 etapa 2. síntesis de (H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) enlace disulfuro [Es decir, síntesis de un compuesto representado por la fórmula (5):



55 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro]

El H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (50 mg) obtenido en el etapa 1 y H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (es decir, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4)) (43 mg) sintetizado por medios de un método conocido (p.ej., documento WO07/063903) se mezclaron, se añadió DMSO (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua con TFA al 0,1% (5 ml) y se purificó
60

mediante HPLC de fase inversa.

bomba: fabricada por Shimadzu; LC-8A
 columna: YMC ODS-A 3 cmφ × 25 cmL, 10 μm
 eluato 1: H₂O/TFA al 0,1%
 eluato 2: CH₃CN/TFA al 0,1%
 velocidad de flujo: 20 ml/min
 detección: UV220 nm

- 5
 10 La solución de reacción se inyectó en una columna equilibrada con 25% de eluato 2. Posteriormente, la concentración de eluato 2 se elevó a una velocidad de 0,25% por minuto. Las fracciones que contenían el producto objeto se recogieron, se liofilizaron, se purificaron nuevamente mediante HPLC de fase inversa, y se liofilizaron para proporcionar (H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) enlace disulfuro (es decir, un compuesto representado por la fórmula (5), 21 mg).
 15 espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1191,8 [M + 2]²⁺
 (Calculado = 1191,9)

Ejemplo 2

- 20 Síntesis del péptido que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos:
 CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13)

- 25 Etapa 1. Utilizando Fmoc-Leu-Alko-resina (Alko es alcohol p-alcoxibencílico) (338 mg, fabricado por Watanabe Chemical, 0,74 mmoles/g, 0,25 mmoles) como material de partida, se realizó dos veces la síntesis en fase sólida como en el método descrito en el Ejemplo 1 para proporcionar H-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Met-Phe-Pro-Asn(Trt)-Ala-Pro-Tyr(tBu)-Leu-Alko-resina (1,54 g). A esta resina peptídica se le añadió una mezcla de TFA/H₂O/TIS = 95/2,5/2,5 (15 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se separó mediante filtración, y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La mezcla de reacción se enfrió con hielo y se añadió éter dietílico (50 ml). El precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con éter y se secó a presión reducida para proporcionar el péptido bruto (637 mg).
 30 espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1211,9 [M + 1]⁺
 (Calculado = 1212,5)

- 35 etapa 2. El péptido bruto (321 mg) obtenido en la etapa 1 se disolvió en TFA (10 ml) y se cargó mediante una bomba de HPLC en una columna YMC-PACK ODS-A de 3 cm x 25 cm L equilibrada con HPLC (fabricada por Shimadzu; LC6AD) eluato 1 = H₂O/TFA al 0,1%. Este estado se mantuvo durante aproximadamente 20 minutos y, después de 20 minutos, la concentración de eluato 2 = CH₃CN/TFA al 0,1% se elevó a 27%. Posteriormente, mientras se realizaba el seguimiento del eluato del péptido objeto mediante UV de 220 nm, la concentración del eluato 2 se elevó a una velocidad de 0,25% por minuto y se recogieron las fracciones que contenían el producto objeto. El péptido (100 mg) obtenido después de la liofilización se purificó nuevamente mediante fase inversa en las mismas condiciones, y el acetonitrilo se evaporó a presión reducida y el residuo se liofilizó para proporcionar el péptido objeto (CRMFPNAPYL (SEQ ID NO: 13), 37,2 mg).
 40

- 45 bomba: fabricada por Shimadzu; LC-6A
 columna: YMC ODS-A 3 cmφ × 25 cmL, 10 μm
 eluato 1: H₂O/TFA al 0,1%
 eluato 2: CH₃CN/TFA al 0,1%
 velocidad de flujo: 20 ml/min
 detección: UV220 nm
 50 espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1212,0 [M + 1]⁺
 (Calculado = 1211,6)

Ejemplos 3 - 5

- 55 Mediante un método similar al del Ejemplo 2, se sintetizaron los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 18 o 17. La Tabla 54 muestra la cantidad sintetizada y los resultados de la espectrometría de masas.

Tabla 54

Núm. de Ej.	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	cantidad sintetizada (mg)	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
3	CALLPAVPSL	16	42	983,8 [M + 1] ⁺	983,2

Núm. de Ej.	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	cantidad sintetizada (mg)	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
4	CRVPGVAPTL	18	53	1012,7 [M + 1H] ⁺	1012,2
5	CSLGEQQYSV	17	31	1113,7 [M + 1] ⁺	1113,2

Ejemplo Experimental 1

Cambios en el tiempo de corte del aminoácido N-terminal mediante ERAP1

5 Los péptidos de SEQ ID NO: 13, 16, 18 y 17 sintetizados en los Ejemplos 2 - 5 se evaluaron para determinar el recorte del aminoácido N-terminal por ERAP1 (PLoS One Noviembre 2008, vol.3, Tema 11, e3658).

10 Se añadieron 30 µl de ERAP1 (2,0 mg/ml) en solución tampón PBS a 258 µl de tampón Tris·HCl. Se añadió solución en DMSO (12,0 µl) de cada péptido 10 mM a la solución ERAP1 mencionada anteriormente, y la mezcla se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente. 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 horas después, se añadieron 50 µl de una muestra a 150 µl de MeOH para terminar la reacción, se inyectaron 25 µl en UFLC (condiciones de análisis mostradas a continuación) y se determinó el AUC del péptido objeto. El péptido obtenido por recorte se sintetizó químicamente por separado y se analizó en condiciones similares sin enzima. La relación de formación del péptido obtenido por recorte se determinó basándose en el AUC obtenido.

condiciones de análisis

20 bomba: UFLC fabricada por Shimadzu
 columna: Shim-pack XR-ODS d.i. 3,0 mmx75 mm
 solución: TFA al 0,1% H₂O (A) - TFA al 0,1% CH₃CN (B)
 temperatura del horno: 40 ° C
 velocidad de flujo: 1,0 ml/min
 longitud de onda de detección: λ = 220 nm

gradiente:

1. La concentración de la SOLUCIÓN B aumentó de 1,0% a 70% de 0,0 min a 5,0 min
2. La concentración de la SOLUCIÓN B aumentó de 1,0% a 50% de 0,0 min a 5,0 min

péptido objeto:

35 En cuanto a los péptidos sintetizados en los Ejemplos 2 - 5, las secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos por recorte del aminoácido N-terminal por ERAP1 se muestran en la Tabla 55.

Tabla 55

	péptido utilizado para la prueba de recorte		péptido obtenido por recorte	
Núm. de Ejemplo	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia
2	CRMFPNAPYL	13	RMFPNAPYL	2
3	CALLPAVPSL	16	ALLPAVPSL	5
4	CRVPGVAPTL	18	RVPGVAPTL	7
5	CSLGEQQYSV	17	SLGEQQYSV	6

Los cambios en el transcurso del tiempo en la velocidad de formación de los péptidos obtenidos por recorte se muestran en la Tabla 56 y la Fig. 1.

Tabla 56

Núm. de Ejemplo	Núm. de secuencia	gradiente	velocidad de formación (%)			
			1 hora después	2 hora después	4 hora después	8 hora después
2	13	1	25,5	35,2	46,2	47,6
3	16	1	65,5	50,6	13,5	0

Núm. de Ejemplo	Núm. de secuencia	gradiente	velocidad de formación (%)			
			1 hora después	2 hora después	4 hora después	8 hora después
4	18	1	59,1	57,5	30,1	7,80
5	17	2	77,6	72,8	46,0	7,90

Los resultados de recorte sugieren fuertemente que, en cualquier péptido extendido con Cys (SEQ ID NO: 13, 16, 17 y 18), la Cys en el extremo N extendido es escindida selectivamente por ERAP-1, concretamente, el péptido extendido con Cys se somete a un recorte apropiado por ERAP-1 sin marcada dependencia de la secuencia peptídica, y finalmente se convierte en el péptido antigénico canceroso objeto (SEQ ID NO: 2, 5, 6 o 7).

Ejemplo experimental 2

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402

El compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 y ratón transgénico HLA-A2402. El compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso B es CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, y CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A24.

El ratón transgénico HLA-A0201 (C57BL/6CrHLA-A2.1DR1) es un ratón defectuoso en MHC de ratón y expresa la quimera HLA de HLA-A0201 de MHC humano y H-2D^b de MHC de ratón y HLA-DRB1*0101. Utilizando este ratón, se puede seleccionar el péptido positivo para HLA-A02 capaz de inducir CTL en seres humanos (Eur J Immunol. 2004; 34: 3060-9). Por otro lado, el ratón transgénico HLA-A2402 (C57BL/6CrHLA-A2402/K^b) es un ratón que expresa la quimera HLA de HLA-A2402 de MHC humano y H-2K^b de MHC de ratón. Utilizando este ratón, se puede seleccionar el péptido positivo para HLA-A24 capaz de inducir CTL en seres humanos (Int J Cancer. 2002; 100: 565-70).

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2, 4) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ mediante reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 4), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5).

Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (5) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 40 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 5 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 4 sitios en la base de la cola de un ratón a 250 μ g/sitio. Una semana más tarde, el ratón se sacrificó con gas CO₂, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a 0,15 x 10⁶ células/pocillo, y los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 se sembraron a 1 x 10⁶ células/pocillo, en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 4) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Además, se añadió el péptido diluido (SEQ ID NO: 4) a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos añadidos con el péptido se cultivaron durante 20 horas a 37°C, CO₂ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 2, y los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402 se muestran en la Fig. 3.

En cada figura, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 2, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2, y en la Fig. 3, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 4. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número del objeto, cada CTL específico de péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5).

En cada figura, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en absoluto en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, la producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201, y la producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 se detectó en los esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (5) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 y CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4. Se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (5) sufre la escisión del enlace disulfuro y el recorte apropiado por ERAP-1 en el ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (5), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos de péptidos diferentes WT1 forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir diferentes tipos de CTL in vivo.

Ejemplos de referencia 1 - 7

Mediante un método similar al del Ejemplo 2, se sintetizaron los péptidos respectivos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, 24, 23, 2, 4, 6 y 5. La Tabla 57 muestra los resultados de la espectrometría de masas. Dado que SEQ ID NO: 22, 24, 23, 2, 4, 6 y 5 no son el compuesto de la presente invención, se describen como ejemplos de referencia.

Tabla 57

Núm. de Ej. Ref.	secuencia de aminoácidos	Núm. de secuencia	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
1	CNKRYFKLSHLQMHSRK	22	1089,1 [M + 2H] ⁺	1089,3
2	CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	24	825,1 [M + 3H] ⁺	824,8
3	CNKRYFKLSHLQMHSRKH	23	772,4 [M + 3H] ⁺	772,2
4	RMFPNAPYL	2	1109,0 [M + H] ⁺	1109,3
5	CYTWNQMNL	4	1172,9 [M + H] ⁺	1173,4
6	SLGEQQYSV	6	1010,9 [M + H] ⁺	1011,1
7	ALLPAVPSL	5	881,0 [M + H] ⁺	881,1

Ejemplos 6 - 9

Mediante un método similar al del Ejemplo 1, se sintetizaron los compuestos (productos conjugados) respectivos representados por las fórmulas (3), (6), (7) y (8). La Tabla 58 muestra los resultados de la espectrometría de masas. (En cada fórmula, el enlace entre C y C es un enlace disulfuro).

Tabla 58

Núm. de Ej.	fórmula estructural	Núm. de fórmula	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
6	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CSLGEQQYSV} \end{array}$	(3)	1162,3 [M + 2H] ⁺	1162,0
7		(6)	1228,0 [M + 3H] ⁺	1227,6

Núm. de Ej.	fórmula estructural	Núm. de fórmula	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG} \end{array}$			
8	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRKH} \end{array}$	(7)	705,8 [M + 5H] ⁺	705,3
9	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRK} \end{array}$	(8)	1129,8 [M + 3H] ⁺	1129,2

Ejemplo Experimental 3

Medida de la solubilidad

5

etapa 1. preparación del tampón isotónico

1. Se mezclaron una solución acuosa al 75% de hidrogenofosfato disódico y una solución acuosa al 5,53% de ácido cítrico, y se prepararon tampones respectivos (pH 6,0 y 7,4).

10

etapa 2. preparación de la solución de prueba

Se midió aproximadamente 1 mg de un producto de prueba, se añadió un tampón isotónico (0,5 ml), y esto se utilizó como una solución de prueba. La solución de prueba preparada se agitó a temperatura ambiente durante 90 min (condiciones de agitación: RECIPRO SHAKER SR-1N fabricado por TAITEC, velocidad = 8), se centrifugó (15000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) y el sobrenadante después de la centrifugación se utilizó como una solución de prueba.

15

etapa 3. preparación de la solución patrón

20

Se midió con precisión aproximadamente 1 mg del producto de prueba, se disolvió en TFA al 0,1% en agua/acetonitrilo = 1/1, se hizo la cantidad total de 10 ml, y esto se utilizó como una solución patrón del producto de prueba.

25

etapa 4. medición de la concentración del producto de prueba

La solución patrón del producto de prueba y la solución de prueba se analizaron mediante HPLC (condiciones de análisis descritas en la Tabla 59), y la solubilidad del producto de prueba se calculó a partir de la relación de área de pico de la solución patrón.

30

Condiciones de medición de HPLC

columna: ChemcoPack Quicksorb (4,6 mmφ × 150 mm, 5 μm) fabricada por Chemco Scientific Co., Ltd.
fase móvil: SOLUCIÓN A; agua con TFA al 0,1%, SOLUCIÓN B; Solución de acetonitrilo con TFA al 0,1%
temperatura de la columna: temperatura ambiente
velocidad de flujo: 1 ml/min
longitud de onda de detección: UV 254 nm, 230 nm (detección de 2 longitudes de onda)
Volumen de inyección de muestra: 10 μL

35

Tabla 59

condiciones de análisis de gradiente		
tiempo (min)	SOLUCIÓN A (%)	SOLUCIÓN B (%)
0,00	80	20
10,00	0	100
15,00	0	100
15,01	80	20

condiciones de análisis de gradiente		
tiempo (min)	SOLUCIÓN A (%)	SOLUCIÓN B (%)
25,00	80	20
25,01	PARADA	

Los péptidos sintetizados en los Ejemplos de Referencia 1 - 2 y 4 - 7 y los compuestos (productos conjugados) sintetizados en los Ejemplos 1, 7 y 9 se sometieron a la medición de solubilidad mencionada anteriormente. Cada solubilidad se muestra en la Tabla 60.

5 Tabla 60

Número de ejemplo de referencia o Núm. de ejemplo	secuencia de aminoácidos o fórmula estructural	SEQ ID NO: o Núm. de fórmula	pH 6,0 (mg/mL)	pH 7,4 (mg/mL)
Ejemplo de referencia 6	SLGEQQYSV	SEQ ID NO: 6	>1,0	>1,0
Ejemplo de referencia 7	ALLPAVPSL	SEQ ID NO: 5	>1,0	>1,0
Ejemplo de referencia 2	CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	SEQ ID NO: 24	>1,0	0,556
Ejemplo de referencia 1	CNKRYFKLSHLQMHSRK	SEQ ID NO: 22	>1,0	0,931
Ejemplo 7	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG} \end{array}$	fórmula (6)	>1,0	0,279
Ejemplo 9	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CNKRYFKLSHLQMHSRK} \end{array}$	fórmula (8)	>1,0	0,789
Ejemplo de referencia 4	RMFPNAPYL	SEQ ID NO: 2	>1,0	>1,0
Ejemplo de referencia 5	CYTWNQMNL	SEQ ID NO: 4	0,106	0,167
Ejemplo 1	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CYTWNQMNL} \end{array}$	fórmula (5)	0,511	0,200

Ejemplo experimental 4

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

10 El compuesto representado por la fórmula (3) sintetizado en el Ejemplo 6 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (3):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso B es SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) son péptidos WT1 restringidos a HLA-A0201.

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en el Ejemplo Experimental 2.

25 Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (3) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2, 6) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 6), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (3).

30 Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (3) se disolvió en agua para inyectables a 10 mg/ml, y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto

emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 500 µg/sitio. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO₂, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a $0,75 \times 10^6$ células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 6) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 µg/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2, 6) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 µg/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 20 horas a 37°C, CO₂ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 4.

En la Fig. 4, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 4, la barra de color negro y la barra sombreada muestran los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsan con cada péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, 6, y la barra de color blanco muestra los resultados de cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro o sombreada y la barra de color blanco muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración de un compuesto representado por la fórmula (3) dio como resultado la inducción de CTL específicos para cada péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, 6 in vivo en el ratón. En la Figura 4, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, 6 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (3) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, 6. Se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (3) experimenta escisión del enlace disulfuro y el recorte apropiado por ERAP-1 en el ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y 6. Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (3), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos de péptidos diferentes forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir diferentes dos tipos de CTL in vivo.

Ejemplo experimental 5

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

El compuesto representado por la fórmula (6) sintetizado en el Ejemplo 7 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (6):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso C es CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, y CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en el Ejemplo Experimental 2. Utilizando este ratón, se puede seleccionar el péptido HLA-A02 capaz de inducir CTL en seres humanos, así como se puede evaluar la actividad potenciadora de la inducción de CTL del péptido auxiliar capaz de inducir células T auxiliares mediante la unión a HLA-DRB1*0101 humano.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (6) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) y células reactivas con el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 24) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 24), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto

representado por la fórmula (6). Además, los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (6) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por SEQ ID NO: 2 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2), y se comparó el número de células productoras de IFN γ .

Específicamente, un péptido representado por SEQ ID NO: 2 se disolvió en agua para inyectables a 6 mg/ml, y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El péptido emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Un compuesto representado por la fórmula (6) se disolvió en agua para inyectables (19,8 mg/ml) y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 495 μ g/sitio. El número de moles del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis del compuesto representado por la fórmula (6) por ratón se ajustó para que fuera igual al del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis por ratón. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con CO $_2$ gas, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a 0,25 \times 10 6 células/pocillo o 0,5 \times 10 6 células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 24) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2, 24) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 20 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en las Fig. 5 y 6.

En la Fig. 5 y 6, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el compuesto o péptido administrados al ratón. En la figura 5, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y la barra de color blanco muestra los resultados de cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 o un compuesto representado por la fórmula (6) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 in vivo en el ratón. En la Figura 5, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201. Además, en la Fig. 5, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujeron mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (6), fue mayor que el de células productoras de IFN γ específicas para el péptido inducidas por la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

En la Fig. 6, además, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24, y la barra de color blanco muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de células reactivas con péptido, y que la administración de un compuesto representado por la fórmula (6) dio como resultado la inducción de células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo en el ratón, y la administración de un compuesto representado por SEQ ID NO: 2 no indujo células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo en el ratón. En la Figura 6, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (6) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 y células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24. Se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (6) sufre la escisión del enlace disulfuro y el recorte apropiado por ERAP-1 en el ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y 24. Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24 producido a partir de un compuesto representado por la fórmula (6) potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, en comparación con la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (6), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

5

Ejemplo experimental 6

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

El compuesto representado por la fórmula (8) sintetizado en el Ejemplo 9 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (8):



15

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso C es CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, y CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

20

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

25

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (8) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) y células reactivas con el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 22) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 22), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (8). Además, los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (8) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por SEQ ID NO: 2 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2), y se comparó el número de células productoras de IFN γ .

30

35

Específicamente, un péptido representado por SEQ ID NO: 2 se disolvió en agua para inyectables a 6 mg/ml, y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El péptido emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Un compuesto representado por la fórmula (8) se disolvió en agua para inyectables (18 mg/ml) y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 450 μ g/sitio. El número de moles del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis del compuesto representado por la fórmula (8) por ratón se ajustó para que fuera igual al del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis por ratón. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a 0,25 $\times 10^6$ células/pocillo o 0,5 $\times 10^6$ células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 22) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% hasta 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2, 22) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 20 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

40

45

50

55

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en las Fig. 7 y 8.

60

En las Fig. 7 y 8, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el compuesto o péptido administrados al ratón. En la figura 7, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y la barra de color blanco muestra los resultados de cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 o un compuesto representado por

la fórmula (8) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 in vivo en el ratón. En la Figura 7, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201. Además, en la Fig. 7, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujeron mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (8), fue mayor que el de células productoras de IFN γ específicas para el péptido inducidas por la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

En la Fig. 8, además, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22, y la barra de color blanco muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de células reactivas con péptido, y que la administración de un compuesto representado por la fórmula (8) dio como resultado la inducción de células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 22 in vivo en el ratón, y la administración de un péptido representado por SEQ ID NO: 2 no indujo células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 in vivo en el ratón. En la Figura 8, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (8) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 y células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 22. Se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (8) sufre la escisión del enlace disulfuro y el recorte apropiado por ERAP-1 en el ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y 22. Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 22 producido a partir de un compuesto representado por la fórmula (8) potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, en comparación con la administración del compuesto mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (8), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

Ejemplo 10

Mediante un método similar al del Ejemplo 1, se sintetizaron los compuestos (productos conjugados) respectivos representados por la fórmula (9). La Tabla 61 muestra los resultados de la espectrometría de masas. (En cada fórmula, el enlace entre C y C es un enlace disulfuro).

[Tabla 61]

Núm. de Ej.	fórmula estructural	Núm. de fórmula	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/Z	espectrometría de masas: calculado
10	CALLPAVPSL CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	9	1151,9 [M + 3H] ³⁺	1152,0

Ejemplo de referencia 8 - 9

Mediante un método similar al del Ejemplo 2, se sintetizaron los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NO: 238 - 239. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la Tabla 62. Dado que los péptidos descritos en la Tabla no son el compuesto de la presente invención, se indican como Ejemplos de Referencia.

[Tabla 62]

Núm. de Ej. Ref.	secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/Z	espectrometría de masas: calculado
8	RMFPNAPYLCYTWNQMNL	238	1132,2 [M + 2H] ²⁺	1132,3
9	CYTWNQMNLRMFPNAPYL	239	1133,0 [M + 2H] ²⁺	1132,3

Ejemplos de referencia 10 - 11

Mediante un método similar al del Ejemplo 2, se sintetizaron los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NO: 240 - 241. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la Tabla 63. Dado que los péptidos descritos en la Tabla no son el compuesto de la presente invención, se indican como Ejemplos de Referencia.

[Tabla 63]

Núm. de Ej. Ref.	secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/Z	espectrometría de masas: calculado
10	RMFPNAPYLGGGGGGCTWQNMNL	240	1303,7 [M + 2H] ²⁺	1303,5
11	CYTWNQMNGGGGGGRMFPNAPYL	241	1303,0 [M + 2H] ²⁺	1303,5

Los péptidos que se muestran en la Tabla 63 se sintetizaron haciendo referencia al documento que no está relacionado con patentes, Cancer Science, enero de 2012, vol. 103, Núm. 1, 150-153.

Ejemplo experimental 7**Prueba de estabilidad de la vacuna conjugada y combinada****etapa 1**

El producto conjugado (Núm. de fórmula: (6)) (2,4 mg) se disolvió en 120 µL de agua para inyectables y se conservó bajo sombra a temperatura ambiente.

etapa 2

Como vacuna combinada, el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 (1,1 mg) se disolvió en 180 µL de agua para inyectables, se utilizaron 123 µL del mismo para disolver el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 (1,3 mg), y la solución se conservó bajo sombra a temperatura ambiente.

etapa 3

Las soluciones (2,5 µL) obtenidas en el etapa 1 y etapa 2 se diluyeron con agua para inyectables (50 µL) y se sometieron a análisis HPLC (las condiciones de análisis se muestran a continuación), y se midió el porcentaje de contenido de producto conjugado y péptido en la solución acuosa con el valor del área inmediatamente después del comienzo de la conservación como 100%. El porcentaje de contenido de producto conjugado se muestra en la Tabla 64, y el de cada péptido en la vacuna combinada se muestra en la Tabla 65.

condiciones de análisis

bomba: UFLC fabricada por Shimadzu
 columna: Kinetex 2,6u C18 100A d.i. 3,0 mm x 75 mm
 fase móvil: SOLUCIÓN A; agua con TFA al 0,1%, SOLUCIÓN B; Solución de acetonitrilo con TFA al 0,1%
 temperatura de la columna: 40°C
 velocidad de flujo: 1 ml/min
 longitud de onda de detección: UV 220, 254 nm (detección de 2 longitudes de onda)
 Volumen de inyección de muestra: 10 µL

[Tabla 64]

tiempo transcurrido	porcentaje de contenido de la fórmula Núm. 6 (%)
1 día	107
2 semanas	96

[Tabla 65]

tiempo transcurrido	SEQ ID NO: 2 porcentaje de contenido (%)	SEQ ID NO: 24 porcentaje de contenido (%)
1 día	97	65
1 semana	99	9

tiempo transcurrido	SEQ ID NO: 2 porcentaje de contenido (%)	SEQ ID NO: 24 porcentaje de contenido (%)
2 semanas	94	6

En el ejemplo experimental 7, el producto conjugado representado por la fórmula Núm. (6) contenía 96% del compuesto representado por la fórmula (6) en el punto temporal de 2 semanas desde la preparación de la solución. Por el contrario, en una solución mixta de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 24, que es una vacuna combinada, el porcentaje de contenido de SEQ ID NO: 24 disminuyó a 65% en el punto temporal de 1 día transcurrido, y a 6% 2 semanas después. Estos resultados muestran que el producto conjugado conservado en forma de una solución acuosa era más estable que la vacuna combinada conservada en las mismas condiciones.

Ejemplo Experimental 8

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

El compuesto representado por la fórmula (7) sintetizado en el Ejemplo 8 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (7):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso C es CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, y CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los Ejemplos Experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (7) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) y células reactivas con el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 23) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 23), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (7). Además, los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (7) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por SEQ ID NO: 2 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2), y se comparó el número de células productoras de IFN γ .

Específicamente, un péptido representado por SEQ ID NO: 2 se disolvió en agua para inyectables a 6 mg/ml, y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El péptido emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Un compuesto representado por la fórmula (7) se disolvió en agua para inyectables (19 mg/ml) y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 475 μ g/sitio. El número de moles del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis del compuesto representado por la fórmula (7) por ratón se ajustó para que fuera igual al del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis por ratón. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a 0,25 \times 10 6 células/pocillo o 0,5 \times 10 6 células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 23) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2, 23) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 17 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en las Fig. 9 y 10. En las Fig. 9 y 10, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el compuesto o péptido administrados al ratón. En la figura 9, la barra de color negro muestra

los resultados del cultivo de esplenocitos de ratón transgénicos HLA-A0201 mientras se pulsaron con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y la barra de color blanco muestra los resultados de cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 o un compuesto representado por la fórmula (7) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 in vivo en el ratón. En la Figura 9, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201. Además, en la Figura 9, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujeron mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (7), fue mayor que el de células productoras de IFN γ específicas para el péptido inducidas por la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

En la Fig. 10, además, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsaron con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 23, y la barra de color blanco muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de células reactivas al péptido, y que la administración de un compuesto representado por la fórmula (7) dio como resultado la inducción de células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 23 in vivo en el ratón, y la administración de un péptido representado por SEQ ID NO: 2 no indujo células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 23 in vivo en el ratón. En la Fig. 10, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (7) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 y células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 23. Se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (7) sufre la escisión del enlace disulfuro y el recorte apropiado por ERAP-1 en el ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y 23. Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 23 producido a partir de un compuesto representado por la fórmula (7) potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, en comparación con la administración del compuesto mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (7), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

40 Ejemplo Experimental 9

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

El compuesto representado por la fórmula (9) sintetizado en el Ejemplo 10 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (9):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5) y el péptido antigénico canceroso C es CNKRYFKLSHLQMHSRKHG (SEQ ID NO: 24). ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201 y HLA-A2402, y CNKRYFKLSHLQMHSRKHG (SEQ ID NO: 24) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (9) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 5) y células reactivas con el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 24) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ mediante reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 5, 24), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (9). Además, los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (9) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado

anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por SEQ ID NO: 5 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 5), y se comparó el número de células productoras de IFN γ .

Específicamente, un péptido representado por SEQ ID NO: 5 se disolvió en agua para inyectables a 6 mg/ml, y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El péptido emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Un compuesto representado por la fórmula (9) se disolvió en agua para inyectables (23,6 mg/ml) y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 590 μ g/sitio. El número de moles del péptido de SEQ ID NO: 5 contenido en la dosis del compuesto representado por la fórmula (9) por ratón se ajustó para que fuera igual al del péptido de SEQ ID NO: 5 contenido en la dosis por ratón. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con CO $_2$ gas, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a $0,25 \times 10^6$ células/pocillo o $0,75 \times 10^6$ células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 5, 24) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% hasta 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 5, 24) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 17 horas a 37°C, 5% de CO $_2$, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en las Fig. 11 y 12. En las Fig. 11 y 12, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el compuesto o péptido administrado al ratón. En la Fig. 11, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5, y la barra de color blanco muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y blanca muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5 o un compuesto representado por la fórmula (9) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5 in vivo en el ratón. En la Fig. 11, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201. En la Fig. 11, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5, que se indujeron mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (9), fue más alto que el de células productoras de IFN γ específicas para el péptido inducidas por la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5.

En la Fig. 12, además, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24, y la barra de color blanco muestra los resultados de cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de células reactivas de péptido, y que la administración de un compuesto representado por la fórmula (9) dio como resultado la inducción de células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo en el ratón, y la administración del péptido representado por SEQ ID NO: 5 no indujo células reactivas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 in vivo en el ratón. En la Figura 12, el valor de la barra de color blanco apenas se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en ausencia de pulsación con el péptido objeto.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (9) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5 y CTL reactivos con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24. Se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (9) sufre la escisión del enlace disulfuro y el recorte apropiado por ERAP-1 en el ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 5 y 24. Se supuso que la inducción de la célula que reacciona con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24 producido a partir de un compuesto representado por la fórmula (9) potencia la inducción de CTL específicos del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5, y se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 5, en comparación con la administración del compuesto mostrado mediante SEQ ID NO: 5.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (9), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

Ejemplo comparativo 1**Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402**

El compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238 y 239 sintetizados en los Ejemplos de Referencia 8 y 9 se evaluaron para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando HLA-A0201 ratón transgénico y ratón transgénico HLA-A2402. El compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, se describe como en el Ejemplo Experimental 2. El péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238 y 239 es un péptido de cadena larga en donde RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2), que es un HLA Péptido WT1 restringido a A0201, y CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4), que es péptido WT1 restringido a HLA-A2402, están unidos mediante un enlace amida.

El ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402 se describen como en el Ejemplo Experimental 2.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238, 239 de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2, 4) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 4), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238, 239.

Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238, 239 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 40 mg/ml, se diluyeron adicionalmente con agua para inyectables a 5 mg/ml, y se emulsionaron mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 4 sitios en la base de la cola de un ratón a 250 μ g/sitio. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a $0,25 \times 10^6$ células/pocillo, y esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 se sembraron a 1×10^6 células/pocillo, en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 4) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Además, se añadió el péptido diluido (SEQ ID NO: 4) a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 18 horas a 37°C, 5% de CO $_2$, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 13, y los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402 se muestran en la Fig. 14.

En cada Figura, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 13, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2, y en la Fig. 14, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 4. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238, 239.

En cada Figura, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en absoluto en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, la producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 se detectó en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5), y producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 se detectó en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A02402 al que se había administrado un

compuesto representado por la fórmula (5). Por otro lado, aunque se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238; sin embargo, cuando se comparó con los esplenocitos derivados del ratón transgénico HLA-A2402 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5), el número de los mismos era muy pequeño. La producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 se detectó en los esplenocitos derivados del ratón transgénico HLA-A2402 al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 238. Mientras que la producción de IFN γ es específica del péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 se detectó en los esplenocitos derivados del ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 239; sin embargo, cuando se comparó con los esplenocitos derivados del ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5), el número de los mismos era pequeño. La producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 se detectó en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 al que se había administrado el péptido SEQ ID NO: 239.

A partir de esto, se ha aclarado que el compuesto representado por la fórmula (5) de la presente invención es capaz de inducir eficazmente CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 y CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4. Por otro lado, el péptido de cadena larga mostrado mediante SEQ ID NO: 238, 239 no podría inducir eficazmente tanto los CTL específicos del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 como los CTL específicos del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4 .

Ejemplo Comparativo 2

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402

El compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 240 y 241 sintetizados en los Ejemplos de Referencia 10 y 11 se evaluaron para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando ratón transgénico HLA-A0201 y ratón transgénico HLA-A2402. El compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, se describe como en el Ejemplo Experimental 2. El péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 240 y 241 es un péptido de cadena larga en donde RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2), que es un HLA Péptido WT1 restringido a A0201, y CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4), que es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, se unen mediante un enlace amida a través de 6 glicinas como espaciador peptídico.

El ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402 son los indicados en el Ejemplo experimental 2.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 240, 241 de como resultado la inducción de CTL específicos del péptido objeto (SEQ ID NO: 2, 4) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ mediante reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 4), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 240, 241.

Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (5) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 10 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 500 $\mu\text{g/sitio}$. Además, los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 240, 241 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyeron adicionalmente con agua para inyectables a 11 mg/ml y se emulsionaron mezclando con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 550 $\mu\text{g/sitio}$. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO₂, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A0201 preparados a $0,25 \times 10^6$ células/pocillo y esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402 a $1,5 \times 10^6$ las células/pocillo se sembraron en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 4) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 $\mu\text{g/ml}$. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Además, se añadió el péptido diluido (SEQ ID NO: 4) a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Los esplenocitos a los que se había añadido

el péptido se cultivaron durante 17 horas a 37°C, CO₂ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

5 Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 15, y los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402 se muestran en la Fig. 16.

10 En cada figura, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 15, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2, y en la Fig. 16, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 4. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) y los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 240, 241.

20 En cada Figura, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5), y se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5). Por otro lado, la producción de IFN γ específica para el péptido objeto que se muestra por SEQ ID NO: 2 era extremadamente menor en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 240; sin embargo, la producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 se detectó en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A02402 al que se había administrado un compuesto representado por SEQ ID NO: 240. Además, producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 fue extremadamente menor en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 241. Mientras que se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 241; sin embargo, cuando se comparó con los esplenocitos derivados del ratón transgénico HLA-A2402 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5), el número de los mismos fue muy pequeño.

35 A partir de esto, se ha aclarado que el compuesto representado por la fórmula (5) de la presente invención es capaz de inducir eficazmente CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 y CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4. Por otro lado, el péptido de cadena larga que contiene el espaciador peptídico mostrado mediante SEQ ID NO: 240, 241 no podría inducir eficazmente tanto los CTL específicos del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 como los CTL específicos del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4.

Ejemplo Experimental 10

45 El péptido sintetizado en el Ejemplo de Referencia 3 y los compuestos (productos conjugados) sintetizados en los Ejemplos 6 y 9 se sometieron a la medición de solubilidad mediante un método similar al del Ejemplo Experimental 3. Cada solubilidad se muestra en la Tabla 66.

[Tabla 66]

Núm. de Ej. y Ej. de Ref.	secuencia de aminoácidos o fórmula estructural	SEQ ID NO: o Núm. de fórmula	pH 6,0 (mg/mL)	pH 7,4 (mg/mL)
Ej. de Ref. 3	CNKRYFKLSHLQMHSRKH	SEQ ID NO: 23	>1,0	0,712
Ex. 6	<p style="text-align: center;">CRMFPNAPYL CSLGEQQYSV</p>	fórmula (3)	>1,0	>1,0
Ex. 10	<p style="text-align: center;">CALLPAVPSL CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG</p>	fórmula (9)	>1,0	0,565

Ejemplos 11 - 12

- 5 Mediante un método similar al del Ejemplo 2, se sintetizaron los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 242 - 243. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la Tabla 67. Los péptidos descritos en la Tabla 67 son los compuestos de la presente invención.

[Tabla 67]

Núm. de Ej.	secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
11	CWAPVLDFAPPGASAYGSL	242	1923,5 [M + H] ¹⁺	1923,2
12	WAPVLDFAPPGASAYGSLC	243	1923,6 [M + H] ¹⁺	1923,2

Ejemplo 13

- 10 Mediante un método similar al del Ejemplo 1, se sintetizó cada compuesto (producto conjugado) representado por la fórmula 10. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la Tabla 68, en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

[Tabla 68]

Núm. de Ej.	fórmula estructural	Núm. de fórmula	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
13	$\begin{array}{c} \text{CRMFPNAPYL} \\ \\ \text{CWAPVLDFAPPGASAYGSL} \end{array}$	10	1566.6 [M + 2H] ²⁺	1566,8

Ejemplo de referencia 12

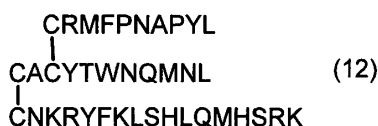
- 15 Mediante un método similar al del Ejemplo 1, se sintetizó cada compuesto (producto conjugado) representado por la fórmula 11. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la Tabla 69, en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro. El péptido descrito en la Tabla no es el compuesto de la presente invención, y por lo tanto, se describe como Ejemplo de Referencia.
- 20

[Tabla 69]

Núm. de Ej. Ref.	fórmula estructural	Núm. de fórmula	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculada
12	$\begin{array}{c} \text{WAPVLDFAPPGASAYGSLC} \\ \\ \text{CRMFPNAPYL} \end{array}$	11	1044,8 [M + 3H] ³⁺	1044,9

Ejemplo 14

- 25 Síntesis del compuesto representado por la fórmula (12):



- 30 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro

etapa 1. Síntesis de Fmoc-Cys(Mmt)-Ala-SBn (Mmt es 4-Metoxitritilo)**(Síntesis de Fmoc-C(Mmt)A-SBn)**

- 35 Una solución de Fmoc-Cys(Mmt)-OH (4,80 g), N,N-diisopropiletilamina (2,56 ml), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino fosfonio (4,50 g) y H-Ala-SBn sintetizado por medio de un conocido método (por ejemplo, Journal

of Organic Chemistry, vol. 64, Núm. 24 8761-8769) en cloroformo (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna (disolvente de elución, hexano/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto objeto, Fmoc-C(Mmt)A-SBn (2,80 g).

RMN: RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,72 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,38 - 7,34 (m, 7H), 7,29 - 7,25 (m, 6H), 7,23 - 7,15 (m, 7H), 6,76 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,15 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,95 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,57 (quin, J = 7,6 Hz, 1H), 4,35 (d, J = 6,8 Hz, 2H) 4,19-4,17 (m, 1H), 4,04 (s, 2H), 3,73 (s, 3H), 2,72 (dd, J = 13,2, 8,4 Hz, 1H), 2,61 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 1,31 (d, J = 7,2 Hz, 3H).

etapa 2. Síntesis de H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH

(Síntesis de C(Mmt)ACYTWNQMNL)

Una solución de Fmoc-Cys(Mmt)-Ala-SBn(IIimg) obtenido en la etapa 1, H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (21 mg) sintetizado por medio de un método conocido (por ejemplo, documento WO07/063903), N,N-diisopropiletilamina (200 μL), hidrocloreto de ácido 3,3',3"-Fosfanotriil-tripropanoico (1 mg), ácido 4-mercaptofenilacético (1 mg) y tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,5, 200 μL) en DMF (400 μL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. A la mezcla de reacción se le añadió dietilamina (200 μL) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar el objeto compuesto, C(Mmt)ACYTWNQMNL (7 mg).

espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 810,2 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$
(Calculado = 810,5)

etapa 3. Síntesis de (H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) enlace disulfuro

[es decir, síntesis de un compuesto representado por la fórmula (13):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

Una solución de H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (51 mg) obtenido en el etapa 2 y (H-Cys(Npys)-Arg- Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (43 mg) obtenido en el Ejemplo 1, etapa 1 en DMF (4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC de fase inversa para proporcionar 39 mg del compuesto objeto, (H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met) -Phe-Pro-As-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) enlace disulfuro [es decir, un compuesto representado por la fórmula (13)].

espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1414,4 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$
(Calculado = 1415,2)

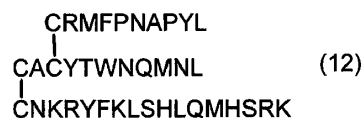
etapa 4. Síntesis de H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH

(Síntesis de C(SPy)NKRYFKLSHLQMHSRK)

Se obtuvo una solución al 20% p/p de H-Cys-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH (182 mg) en el Ejemplo de Referencia 1 y bisulfuro de 2,2'-dipiridilo (solución en isopropanol 0,2 M, 544 μl) en agua con ácido acético (4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar el compuesto objeto, H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser -Arg-Lys-OH (177 mg).

espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1143,5 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$
(Calculado = 1142,9)

etapa 5. Síntesis de un compuesto representado por la fórmula (12):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro

Una solución de (H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) enlace disulfuro obtenido en el etapa 3 [es decir, un compuesto representado por la fórmula (13)] (9

mg), H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH (24 mg) obtenido en el etapa 4 y triisopropilsilano (10 µL) en ácido trifluoroacético (190 µL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC de fase inversa para proporcionar el compuesto objeto, un compuesto representado por la fórmula 12 (5 mg).

- 5 espectrometría de masas: LC-ESI/MS $m/z = 1577,2 [M + 3H]^{3+}$
(Calculado = 1577,9)

Ejemplos 15 - 16

- 10 Mediante un método similar al del Ejemplo 14, se sintetizó cada compuesto (producto conjugado) representado por la fórmula 14 o 15. Los resultados de la espectrometría de masas se muestran en la Tabla 70, en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

[Tabla 70]

Núm. de Ej.	fórmula estructural	Núm. de fórmula	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
15	<pre> CRMFPNAPYL CACYTWNQMNL CWAPVLDFA PPGASAYGSL </pre>	14	$1492,5 [M + 3H]^{3+}$	1493,1
16	<pre> CWAPVLDFA PPGASAYGSL CACYTWNQMNL CRMFPNAPYL </pre>	15	$1492,5 [M + 3H]^{3+}$	1493,1

15 Ejemplo de referencia 13

Mediante un método similar al del Ejemplo 2, se sintetizaron los péptidos que consistían en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 244. La Tabla 71 muestra los resultados de la espectrometría de masas. El péptido descrito en la Tabla no es el compuesto de la presente invención, y por lo tanto, se describe como Ejemplo de Referencia.

20

[Tabla 71]

Núm. de Ej. Ref.	secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z	espectrometría de masas: calculado
13	WAPVLDFA PPGASAYGSL	244	$1819,8 [M + H]^+$	1819,1

Ejemplo Experimental 11

25 Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

El compuesto representado por la fórmula (10) sintetizado en el Ejemplo 13 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (10):

30



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente,

- 35 en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso B es WAPVLDFA
PPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, y WAPVLDFA
PPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

- 40 El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (10) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (10). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244) funcione o no en el organismo vivo se juzgó mediante comparación del número de células productoras de IFN γ cuando a los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente se les administró un compuesto representado por la fórmula (10) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 se volvieron a estimular con el péptido (SEQ ID NO: 2).

Específicamente, un compuesto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 3 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Además, un compuesto representado por la fórmula (10) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 8,5 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de coadyuvante de Freund incompleto (IFA). El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 425 μ g/sitio. El número de moles del péptido de SEQ ID NO: 2 contenido en la dosis de un compuesto representado por la fórmula (10) por ratón se controló para que fuera igual al número de moles contenido en la dosis del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 por ratón. Además, la concentración de DMSO contenida en cada emulsión también se estableció al mismo nivel. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a $0,125 \times 10^6$ células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 4) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 19 horas a 37°C, 5% de CO $_2$, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

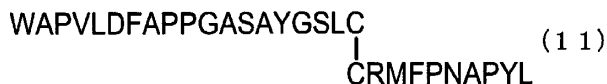
Los resultados del ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 17. En la Fig. 17, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el compuesto o péptido administrados al ratón. En la Fig. 17, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A0201 mientras que pulsas con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y la barra de color blanco muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 o un compuesto representado por la fórmula (10) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 in vivo en el ratón. En la Fig. 17, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201. Además, en la Fig. 17, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujeron mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (10), fue mayor que el de células productoras de IFN γ específicas para el péptido inducidas por la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2.

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (10) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Cuando se administró un compuesto representado por la fórmula (10), se observaron muchas células productoras de IFN γ específicas al péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en comparación con la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 244 producido a partir de un compuesto representado por la fórmula (10) potencia la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (10) se escinde por enlace disulfuro y recorte apropiado por ERAP-1 en ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y 244.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (10), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que dos tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro mostrado en la fórmula (1), y es una vacuna conjugada de péptido antigénico canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

Ejemplo comparativo 3**Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201**

5 El compuesto representado por la fórmula (11) sintetizado en el Ejemplo de referencia 12 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. El compuesto representado por la fórmula (11):



10 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es, en particular, un compuesto de la fórmula (1) mencionada anteriormente, en donde el péptido antigénico canceroso A es RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y el péptido antigénico canceroso C es WAPVLDFA PPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243). RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, y WAPVLDFA PPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

15 El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

20 Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (11) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), de los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (11). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244) funcione o no en el organismo vivo se juzgó por comparación del número de células productoras de IFN γ cuando a los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente se les administró un compuesto representado por la fórmula (11) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 se volvieron a estimular con el péptido (SEQ ID NO: 2).

Mediante un método similar al del Ejemplo Experimental 11, se realizó la prueba de inducción de CTL.

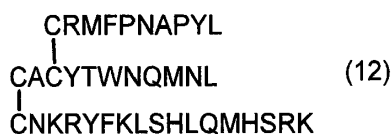
30 Los resultados del ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 18. En la Fig. 18, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el compuesto o péptido administrados al ratón. En la Fig. 18, la barra de color negro muestra los resultados del cultivo de esplenocitos transgénicos de ratón HLA-A0201 mientras se pulsan con el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y la barra de color blanco muestra los resultados de cultivo sin pulsos. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número de CTL específicos de péptido, y que la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 o un compuesto representado por la fórmula (11) dio como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 in vivo en el ratón. En la Fig. 18, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los ratones transgénicos HLA-A0201 no reaccionaron en absoluto en ausencia de pulsación con el péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201. Por otro lado, en la Fig. 18, no se pudo detectar un aumento en las células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración del péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (11).

45 Los resultados del Ejemplo Experimental 11 y del Ejemplo Comparativo 3 sugieren que, cuando se utiliza WAPVLDFA PPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) como péptido WT1 restringido al MHC de clase II, WAPVLDFA PPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) como péptido antigénico canceroso B en la fórmula (1) mencionada anteriormente es una realización más preferible de la invención que WAPVLDFA PPGASAYGSLC (SEQ ID NO: 243) como péptido antigénico canceroso C.

Ejemplo Experimental 12**Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 y ratón transgénico HLA-A2402**

55 La capacidad de inducción de CTL del compuesto representado por la fórmula 12 sintetizado en el Ejemplo 14 se evaluó mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 y un ratón transgénico HLA-A2402. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en el compuesto representado por la fórmula (12):

60



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, y CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402 se describen como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (12) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2, 4) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 4), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (12). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 22) funcione o no en el organismo vivo se juzgó por comparación del número de células productoras de IFN γ cuando a los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente se les administró un compuesto representado por la fórmula (12) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) se volvieron a estimular con el péptido (SEQ ID NO: 2, 4).

Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (5) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 3 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de Montanide ISA51VG. El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Además, un compuesto representado por la fórmula (12) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 6 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de Montanide ISA51VG. El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 300 μ g/sitio. El número de moles del compuesto representado por la fórmula (5) contenido en la dosis del compuesto representado por la fórmula (12) por ratón se controló para que fuera igual al número de moles contenido en la dosis del compuesto representado por la fórmula (5) por ratón. Además, la concentración de DMSO contenida en cada emulsión también se estableció al mismo nivel. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron y los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 se sembraron cada uno a 0,25 x 10 6 células/pocillo, en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2, 4) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Además, se añadió el péptido diluido (SEQ ID NO: 4) a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 17 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 19, y los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402 se muestran en la Fig. 20.

En cada figura, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 19, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2, y en la Fig. 20, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 4. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de compuestos representados por la fórmula (5) y la fórmula (12).

En cada figura, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201, se administraron compuestos representados por la fórmula

(5) y la fórmula (12), y se detectó la producción específica de IFN γ para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402, se administraron compuestos representados por la fórmula (5) y la fórmula (12). En la Fig. 19, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (12), fue mayor que el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5). Por otro lado, en la Fig. 20, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (12), no difirió mucho del número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5).

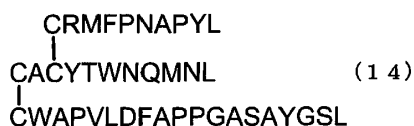
A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (12) puede inducir CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, 4. Cuando se administró un compuesto representado por la fórmula (12), se observaron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en comparación con la administración del compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 22 producida a partir de un compuesto representado por la fórmula (12) potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Se supuso que la ausencia de mucha diferencia en el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4 entre la administración de un compuesto representado por la fórmula 12 y la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) era atribuible a la ausencia de inducción de las células reactivas con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 22, ya que el ratón transgénico HLA-A2402 no expresa el MHC de clase II humano. Por consiguiente, se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (12) experimenta escisión del enlace disulfuro y recorte apropiado por ERAP-1 en ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2, 4 y 22.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (12), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que tres tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro, y es una vacuna conjugada de péptido antígeno canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

Ejemplo experimental 13

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402

La capacidad de inducción de CTL del compuesto representado por la fórmula (14) sintetizado en el Ejemplo 15 se evaluó mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201 y un ratón transgénico HLA-A2402. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en un compuesto representado por la fórmula (14):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244) es un péptido WT1 restringido a MHC clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 y el ratón transgénico HLA-A2402 se describen como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (14) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2, 4) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2, 4), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (14). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244) funcione o no en el organismo vivo se juzgó por comparación del número de células productoras de IFN γ cuando a los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente se les administró un compuesto representado por la fórmula (14) y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) se volvieron a estimular con el péptido (SEQ ID NO: 2).

Mediante un método similar al del Ejemplo Experimental 12, se realizó una prueba de inducción de CTL. El compuesto representado por la fórmula (14) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó con agua para inyectables a 5,6 mg/ml y se mezcló con una cantidad igual de Montanide ISA51VG para proporcionar una emulsión. El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a

280 µg/sitio.

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 21, y los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A2402 se muestran en la Fig. 22.

En cada figura, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 21, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2, y en la Fig. 22, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A2402 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 4. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestra el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de compuestos representados por las fórmulas (5) y (14).

En cada figura, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se habían administrado compuestos representados por las fórmulas (5) y (14) y se detectó la producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 4 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A2402 al que se habían administrado compuestos representados por las fórmulas (5) y (14). En las Fig. 21 y 22, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, 4, que fue inducido mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (14), fue mayor que el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido, que se indujeron mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5).

A partir de lo anterior, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (14) puede inducir CTL específicos para los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2 y 4. Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 244 producido a partir de un compuesto representado por la fórmula (14) potenció la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, y se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 cuando se administró un compuesto representado por la fórmula (14) en comparación con la administración de un compuesto representado por la fórmula (5). Por otro lado, se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4 cuando se administró un compuesto representado por la fórmula (14) en comparación con la administración de un compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 se unía al MHC de clase II de ratón expresado en el ratón transgénico HLA-A2402 para inducir la célula reactiva con el péptido auxiliar, lo que a su vez potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 4. Por lo tanto, se sugirió fuertemente que el compuesto representado por la fórmula (14) experimentaba escisión del enlace disulfuro y recorte apropiado por ERAP-1 en ratón in vivo y de hecho es procesado a los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2, 4 y 244.

Es decir, se aclaró que un compuesto representado por la fórmula (14), que es una realización del compuesto de la presente invención, es un producto conjugado en el que tres tipos diferentes de péptidos forman un compuesto a través del enlace disulfuro, y es una vacuna conjugada de péptido antígeno canceroso WT1 que de hecho puede inducir CTL y células reactivas con el péptido auxiliar in vivo.

Ejemplo experimental 14

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

Una vacuna combinada que es una mezcla del compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 sintetizado en el Ejemplo de referencia 1 se evaluó para determinar la capacidad de inducción de CTL mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en el compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, y CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22) es péptido WT1 restringido al MHC clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 22) mezclado con la fórmula (5) trabaje o no en el organismo vivo se juzgó mediante comparación del número de células productoras de IFN γ cuando los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2).

Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (5) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 3 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de Montanide ISA51VG. El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Además, un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyeron con agua para inyectables y se mezclaron de tal manera que la concentración después de la dilución fue de 3 mg/ml para el compuesto representado por la fórmula (5), y de 2,7 mg/ml para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22. La solución diluida se mezcló con una cantidad igual de Montanide ISA51VG para proporcionar una emulsión. La vacuna combinada que contenía un compuesto representado por la fórmula (5) a 150 μ g/sitio, y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 a 137 μ g/sitio se administró intradérmicamente a 2 sitios en la base de la cola de un ratón. La concentración de DMSO de cada emulsión se ajustó al mismo nivel. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$, se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a 0,25 $\times 10^6$ células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% hasta 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 17 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%, por medio de lo cual se realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 23.

En la Fig. 23, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 23, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestran el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 22).

En la Fig. 23, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo, y una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 22). En la Fig. 23, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración de una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 22), era más alto que el número de células productoras de IFN γ específicas de péptido, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) solo.

A partir de lo anterior, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 22 puede inducir CTL específicos para los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2. Además, se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 cuando se administró una vacuna combinada en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 22 contenida en la vacuna combinada aumentaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, se aclaró que la vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido auxiliar puede inducir fuertemente CTL en el organismo del ratón en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5).

Ejemplo Experimental 15

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

5 La capacidad de inducción de CTL de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 sintetizado en el Ejemplo de referencia 13 se evaluó mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en un compuesto representado por la fórmula (5):



10 en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, y WAPVLDFAPPGASAYGSL (SEQ ID NO: 244) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

15 El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

20 Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244) mezclado con la fórmula (5) trabaje o no en el organismo vivo se juzgó mediante comparación del número de células productoras de IFN γ cuando los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2).

25 Mediante un método similar al del Ejemplo Experimental 14, se realizó una prueba de inducción de CTL. Para proporcionar una vacuna combinada, un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyeron con agua para inyectables y se mezclaron de tal manera que la concentración después de la dilución fue 3 mg/ml para el compuesto representado por la fórmula (5), y 2,3 mg/ml para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244. La solución diluida se mezcló con una cantidad igual de Montanide ISA51VG para proporcionar una emulsión. Una vacuna combinada que contenía el compuesto representado por la fórmula (5) a 150 μ g/sitio, y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 a 115 μ g/sitio se administró intradérmicamente a 2 sitios en la base de la cola de un ratón.

30 Los resultados del ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 24.

35 En la Fig. 24, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 24, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestran el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244).

40 En la Fig. 24, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo, y una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244). En la Fig. 24, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración de una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 244), fue mayor que el número de células productoras de IFN γ específicas de péptido, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) solo.

45 A partir de lo anterior, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 puede inducir CTL específicos para los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2. Además, se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 cuando se administró una vacuna combinada en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 244 contenida en la vacuna combinada aumentaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido auxiliar puede inducir

50
55
60

fuertemente CTL en el organismo del ratón en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5).

5 Como realización de producir una vacuna que contiene dos péptidos de antigénicos WT1, se puede mencionar una vacuna combinada que contiene dos péptidos diferentes como una única preparación. Cuando se produce una vacuna combinada, las propiedades de los péptidos antigénicos cancerosos que se mezclarán plantean un problema. Como se muestra en la Tabla 60 y la Tabla 66, la producción de una combinación de dos péptidos de antigénicos WT1 significa el procesamiento de dos péptidos que tienen diferente solubilidad, a saber, la propiedad, en una preparación. Por el contrario, el producto conjugado de la presente invención es un compuesto en el que dos péptidos antigénicos WT1 están unidos a través de un enlace disulfuro, y muestra una única solubilidad, a saber, la propiedad. Esto significa que el producto conjugado de la presente invención tiene una propiedad única y también tiene la propiedad correspondiente a los dos péptidos antigénicos WT1, como se muestra en el Ejemplo Experimental 2. En este aspecto, se demostró que el producto conjugado de la presente invención es un compuesto capaz de inducir una respuesta a los dos péptidos antigénicos WT1 sin la necesidad de considerar una interacción entre los dos péptidos antigénicos WT1 y similares, a diferencia de las vacunas combinadas.

Ejemplo Experimental 16

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

20 La capacidad de inducción de CTL de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 sintetizado en el Ejemplo de referencia 2 se evaluó mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en un compuesto representado por la fórmula (5):

25



30

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, y CNKRYFKLSHLQMHSRKTG (SEQ ID NO: 24) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

35

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 24) mezclado con la fórmula (5) trabaje o no en el organismo vivo se juzgó mediante la comparación del número de células productoras de IFN γ cuando a los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente se les administró un compuesto representado por la fórmula (5) solo y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2).

40

45

Específicamente, un compuesto representado por la fórmula (5) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyó adicionalmente con agua para inyectables a 3 mg/ml y se emulsionó mediante mezcla con una cantidad igual de Montanide ISA51VG. El compuesto emulsionado se administró por vía intradérmica a 2 sitios en la base de la cola de un ratón a 150 μ g/sitio. Además, un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, y se diluyeron con agua para inyectables. Se mezclaron de manera que la concentración después de la dilución fue de 3 mg/ml para el compuesto representado por la fórmula (5), y 3,11 mg/ml para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24. La solución diluida se mezcló con una cantidad igual de Montanide ISA51VG para proporcionar una emulsión. La vacuna combinada que contenía un compuesto representado por la fórmula (5) a 150 μ g/sitio, y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 a 156 μ g/sitio se administró intradérmicamente a 2 sitios en la base de la cola de un ratón. La concentración de cada emulsión se ajustó al mismo nivel. Una semana más tarde, el ratón fue sacrificado con gas CO $_2$,

55

60

se aisló el bazo y se prepararon esplenocitos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utilizó para la medición de la producción de IFN γ . El día anterior a la preparación de los esplenocitos, una placa ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% al día siguiente. Los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 preparados se sembraron a $0,25 \times 10^6$ células/pocillo en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 2) se disolvió en DMSO a 40 mg/ml, y se diluyó adicionalmente con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% hasta 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 2) se añadió a los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 a una concentración final de 10 μ g/ml. Los esplenocitos a los que se había añadido el péptido se cultivaron durante 19 horas a 37°C, CO $_2$ al 5%, por medio de lo cual se

realizó una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se midió mediante ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

5 Los resultados del ensayo ELISPOT para IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 25.

En la Fig. 25, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 25, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestran el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 24).

En la Fig. 25, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo, y una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 24). En la Fig. 25, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración de una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 24), fue mayor que el número de células productoras de IFN γ específicas de péptido, que se indujo mediante la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5) solo.

A partir de lo anterior, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 24 puede inducir CTL específicos para los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2. Además, se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 cuando se administró una vacuna combinada en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 24 contenida en la vacuna combinada aumentaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido auxiliar puede inducir fuertemente CTL en el organismo del ratón en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5).

35 Ejemplo Experimental 17

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

SEQ ID NO: 242 sintetizado en el Ejemplo 11 es el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 que tiene una cisteína extendida en el N-terminal. SEQ ID NO: 244 en la vacuna combinada en el Ejemplo Experimental 15 muestra una actividad potenciadora de la inducción de CTL. En esta prueba, por lo tanto, se evaluó la capacidad de inducción de CTL de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en un compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, y WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244) contenido en CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 242) mezclado con la fórmula (5) trabaje o no en el organismo vivo se juzgó mediante la comparación del número de células productoras de IFN γ cuando a los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente se les administró un compuesto representado por la fórmula (5) solo y los esplenocitos derivados del ratón

mencionado anteriormente al que se había administrado una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2).

5 Mediante un método similar al del Ejemplo Experimental 16, se realizó una prueba de inducción de CTL. Para proporcionar una vacuna combinada, un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyeron con agua para inyectables y se mezclaron de tal manera que la concentración después de la dilución fue 3 mg/ml para el compuesto representado por la fórmula (5), y 2,42 mg/ml para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242. La solución diluida se mezcló con una cantidad igual de Montanide ISA51VG para proporcionar una emulsión. Una vacuna combinada que
10 contenía el compuesto representado por la fórmula (5) a 150 µg/sitio, y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 a 121 µg/sitio se administró intradérmicamente a 2 sitios en la base de la cola de un ratón.

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 26.

15 En la Fig. 26, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 26, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestran el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de una vacuna combinada que
20 contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 242).

En la Fig. 26, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo, y una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 242). En la Fig. 26, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración de una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 242), fue mayor que el número de células productoras de IFN γ específicas de péptido, que se indujo mediante la administración de un
25 compuesto representado por la fórmula (5) solo.

A partir de lo anterior, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 puede inducir CTL específicos para los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2. Además, se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido
35 mostrado mediante SEQ ID NO: 2 cuando se administró una vacuna combinada en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 244 contenido en el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 242 contenido en la vacuna combinada potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido auxiliar puede inducir fuertemente CTL en el organismo del ratón en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5)

Ejemplo Experimental 18

45 Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A0201

SEQ ID NO: 243 sintetizado en el Ejemplo 12 es el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 244 que tiene una cisteína extendida en el N-terminal. SEQ ID NO: 244 en la vacuna combinada en el Ejemplo Experimental 15 muestra una actividad potenciadora de la inducción de CTL. En esta prueba, por lo tanto, la capacidad de inducción de CTL de una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) sintetizado en el Ejemplo 1 y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 se evaluó mediante una prueba de inducción de CTL in vivo utilizando un ratón transgénico HLA-A0201. RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) contenido en un compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, es un péptido WT1 restringido a HLA-A0201, CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) es un péptido WT1 restringido a HLA-A2402, y WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244) contenido en WAPVLDFAAPPASAYGSLC (SEQ ID NO: 243) es un péptido WT1 restringido al MHC de clase II (a saber, péptido auxiliar).

El ratón transgénico HLA-A0201 se describe como en los ejemplos experimentales 2 y 5.

Que la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) de como resultado la inducción de CTL específicos para el péptido objeto (SEQ ID NO: 2) se juzgó basándose en la medición de la producción de IFN γ por medio de reestimulación, con el péptido (SEQ ID NO: 2), del esplenocito derivado del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5). Que el péptido auxiliar (SEQ ID NO: 243) mezclado con la fórmula (5) trabaje o no en el organismo vivo se juzgó mediante comparación del número de células productoras de IFN γ cuando los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo y los esplenocitos derivados del ratón mencionado anteriormente al que se había administrado una vacuna combinada de un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 se reestimularon con el péptido (SEQ ID NO: 2).

Mediante un método similar al del Ejemplo Experimental 16, se realizó una prueba de inducción de CTL. Para proporcionar una vacuna combinada, un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 80 mg/ml, se diluyeron con agua para inyectables y se mezclaron de tal manera que la concentración después de la dilución fue 3 mg/ml para el compuesto representado por la fórmula (5), y 2,42 mg/ml para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243. La solución diluida se mezcló con una cantidad igual de Montanide ISA51VG para proporcionar una emulsión. Una vacuna combinada que contenía el compuesto representado por la fórmula (5) a 150 μ g/sitio, y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 a 121 μ g/sitio se administró intradérmicamente a 2 sitios en la base de la cola de un ratón.

Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN γ utilizando el ratón transgénico HLA-A0201 se muestran en la Fig. 27.

En la Fig. 27, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en las células sembradas. En la Fig. 27, la barra de color negro y la barra de color blanco muestran los resultados del cultivo de esplenocitos derivados de ratones transgénicos HLA-A0201 en presencia o ausencia del péptido objeto representado por SEQ ID NO: 2. Es decir, la diferencia en los valores de la barra de color negro y la barra de color blanco muestran el número del objeto, cada CTL específico del péptido inducido en el ratón in vivo mediante la administración de una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 243).

En la Fig. 27, el valor de la barra de color blanco no se detecta. Esto significa que los esplenocitos de los respectivos ratones transgénicos no reaccionaron en ausencia del péptido objeto. Como resultado de esta prueba, se detectó producción de IFN γ específica para el péptido objeto mostrado mediante SEQ ID NO: 2 en los esplenocitos derivados de ratón transgénico HLA-A0201 al que se había administrado un compuesto representado por la fórmula (5) solo, y una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 243). En la Fig. 27, el número de células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2, que se indujo mediante la administración de una vacuna combinada que contenía un péptido auxiliar (SEQ ID NO: 243), fue mayor que el número de células productoras de IFN γ específicas de péptido, que se indujo mediante la administración de un compuesto representado por la fórmula (5) solo.

A partir de lo anterior, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 puede inducir CTL específicos para los péptidos mostrados mediante SEQ ID NO: 2. Además, se encontraron muchas células productoras de IFN γ específicas para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2 cuando se administró una vacuna combinada en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5). Se supuso que la inducción de la célula reactiva con el péptido auxiliar mostrado mediante SEQ ID NO: 244 contenido en el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 243 contenido en la vacuna combinada potenciaba la inducción de CTL específicos para el péptido mostrado mediante SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, se aclaró que una vacuna combinada que contiene un compuesto representado por la fórmula (5) y el péptido auxiliar puede inducir fuertemente CTL en el organismo del ratón en comparación con la administración única de un compuesto representado por la fórmula (5).

Como realización para producir una vacuna que contiene dos péptidos de antígenos WT1, se puede mencionar una vacuna combinada que contiene dos péptidos diferentes como una única preparación. Cuando se produce una vacuna combinada, las propiedades de los péptidos antígenos cancerosos que se mezclarán plantean un problema. Como se muestra en la Tabla 60 y la Tabla 66, la producción de una combinación de dos péptidos de antígenos WT1 significa el procesamiento de dos péptidos que tienen diferente solubilidad, concretamente, la propiedad, en una preparación. Por el contrario, el producto conjugado de la presente invención es un compuesto en el que dos péptidos antígenos WT1 están unidos a través de un enlace disulfuro, y muestra una única solubilidad, a saber, la propiedad. Esto significa que el producto conjugado de la presente invención tiene una propiedad única y también tiene la propiedad correspondiente a los dos péptidos antígenos WT1, como se muestra en el Ejemplo Experimental 2. En este aspecto, se demostró que el producto conjugado de la presente invención es un compuesto capaz de inducir una respuesta a los dos péptidos antígenos WT1 sin la necesidad de considerar una interacción entre los dos péptidos antígenos WT1 y similares, a diferencia de las vacunas combinadas.

Ejemplo Experimental 19

Evaluación de la capacidad de inducción de CTL in vivo utilizando el ratón transgénico HLA-A2402 después de la filtración en filtro

5 El homodímero mostrado mediante SEQ ID NO: 4 formado a través de un enlace disulfuro y un compuesto representado por la fórmula (5) se disuelve en agua para inyectables a 3-10 mg/ml. La actividad farmacológica de cada compuesto se evalúa utilizando un ratón transgénico HLA-A2402 (C57BL/6CrHLA-A2402/K^b) con la actividad de inducción de CTL como índice. Para la administración al ratón transgénico HLA-A2402, el compuesto se disuelve en agua para inyectables, se esteriliza mediante filtración utilizando un filtro de baja unión a proteínas (filtro de membrana del grado que tiene como objeto el tratamiento de esterilización de inyección) y se mezcla con
10 coadyuvante de Freund incompleto para proporcionar una emulsión.

El compuesto emulsionado se administra por vía intradérmica a la raíz de la cola de un ratón transgénico HLA-A2402. Una semana más tarde, el ratón se sacrifica con gas CO₂, se aíslan el bazo o el ganglio linfático inguinal, y se preparan esplenocitos o células de ganglios linfáticos. El kit de ensayo para IFN γ ELISPOT se utiliza para la medición de la producción de IFN γ . El día previo a la preparación de la célula, se trata una placa ELISPOT con un anticuerpo anti-IFN γ de ratón, y se bloquea con medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% al día siguiente. Las células preparadas derivadas de ratón se colocan en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 4) se disuelve en DMSO a 40 mg/ml, y se diluye adicionalmente con medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% a 40 μ g/ml. El péptido diluido (SEQ ID NO: 4) se añade a los esplenocitos o células de ganglios linfáticos transgénicos de
15 ratón HLA-A2402 a una concentración final de 10 μ g/ml. Las células añadidas con el péptido se cultivan durante 16-20 horas a 37°C, CO₂ al 5%, mediante lo cual se realiza una reestimulación peptídica in vitro. Después del cultivo, se elimina el sobrenadante y se permite que la placa ELISPOT desarrolle color de acuerdo con el protocolo adjunto. La cantidad de puntos que desarrollaron color se mide con ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

25 Aplicabilidad industrial

El compuesto de la presente invención es útil como ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer que induce eficazmente CTL y es fácil de producir.

30 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.
International Institute of Cancer Immunology, Inc.

35 <120> Vacuna conjugada de péptido antigénico WT1

<130> 092147

<150> JP 2013-072173

40 <151> 2013-03-29

<150> JP 2013-158383

<151> 2013-07-31

45 <160> 244

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

50 <211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 691 091 T3

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr

ES 2 691 091 T3

145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385 390 395 400

ES 2 691 091 T3

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445

Leu

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> péptido
 <400> 2

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

15 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> péptido
 <400> 3

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

25 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> péptido
 <400> 4

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

35 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> péptido
 <400> 5

Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5

45 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> péptido

ES 2 691 091 T3

<400> 6
 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

10 <400> 7
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

20 <400> 8
 Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 32
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> péptido

30 <400> 9
 Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu
 20 25 30

35 <210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> péptido

<400> 10
 Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His
 1 5 10 15

Ser Arg Lys His Thr Gly
 20

45 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> péptido

<400> 11

ES 2 691 091 T3

Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Glu Ser
 <210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 12
 Ser Gly Gln Ala Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
 1 5 10 15
 Leu Glu Ser
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 13
 Cys Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 14
 Cys Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 15
 Cys Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 16
 Cys Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 10

ES 2 691 091 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> péptido

 <400> 17
 Cys Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5 10

 <210> 18
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> péptido

 <400> 18
 Cys Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 1 5 10

 <210> 19
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 25 <223> péptido

 <400> 19
 Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
 1 5 10 15

 <210> 20
 30 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> péptido

 <400> 20
 Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His
 1 5 10 15

 Ser Arg Lys

 <210> 21
 40 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> péptido

 <400> 21
 Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His
 1 5 10 15

 Ser Arg Lys His
 20

 <210> 22
 50 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55

ES 2 691 091 T3

<220>
 <223> péptido

<400> 22

Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg
1				5					10					15	

5 Lys

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 23

Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg
1				5					10					15	

15 Lys His

<210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> péptido

<400> 24

Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg
1				5					10					15	

25 Lys His Thr Gly

				20											
--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> péptido

<400> 25

Ser	Gly	Gln	Ala	Tyr	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	

35 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> péptido

<400> 26

45 Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala

				1				5							
--	--	--	--	---	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

ES 2 691 091 T3

<220>
 <223> péptido
 <400> 27
 5 Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> péptido
 <400> 28
 15 Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 1 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> péptido
 <400> 29
 25 Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> péptido
 <400> 30
 35 Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> péptido
 <400> 31
 45 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala
 1 5
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> péptido
 <400> 32
 55 Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu
 1 5
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60

ES 2 691 091 T3

<220>
 <223> péptido

 <400> 33
 5 Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> péptido

 <400> 34
 15 Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> péptido

 <400> 35
 25 Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> péptido

 <400> 36
 35 Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> péptido

 <400> 37
 45 Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> péptido

 <400> 38
 55 Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu
 1 5
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 691 091 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 5 <400> 39
 Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe
 1 5
 <210> 40
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 15 <400> 40
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala
 1 5
 <210> 41
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 25 <400> 41
 Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
 1 5
 <210> 42
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 35 <400> 42
 Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 45 <400> 43
 Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 55 <400> 44
 Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 1 5
 <210> 45
 <211> 9

ES 2 691 091 T3

	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> péptido	
	<400> 45	
		Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala
		1 5
	<210> 46	
10	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> péptido	
	<400> 46	
		Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe
		1 5
	<210> 47	
20	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> péptido	
	<400> 47	
		Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile
		1 5
30	<210> 48	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 48	
		Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys
		1 5
40	<210> 49	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 49	
		Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp
		1 5
50	<210> 50	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 50	
		Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala
		1 5
60	<210> 51	

	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 51	
		Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys
		1 5
10	<210> 52	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 52	
		Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu
		1 5
20	<210> 53	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 53	
		Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser
		1 5
30	<210> 54	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 54	
		Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala
		1 5
40	<210> 55	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 55	
		His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
		1 5
50	<210> 56	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> péptido	
	<400> 56	
60		

ES 2 691 091 T3

5 Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr
 1 5

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

 <220>
 <223> péptido
10 <400> 57

 Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val
 1 5

 <210> 58
 <211> 9
15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
20 <400> 58

 Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 1 5

 <210> 59
 <211> 9
25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
30 <400> 59

 Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe
 1 5

 <210> 60
 <211> 9
35 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
40 <400> 60

 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr
 1 5

 <210> 61
 <211> 9
45 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
50 <400> 61

 Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala
 1 5

 <210> 62
 <211> 9
55 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido

ES 2 691 091 T3

	<400> 62											
				Gly	Gln	Phe	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala
				1				5				
	<210> 63											
	<211> 9											
5	<212> PRT											
	<213> Artificial											
	<220>											
	<223> péptido											
10	<400> 63											
				Gln	Phe	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Cys
				1				5				
	<210> 64											
	<211> 9											
15	<212> PRT											
	<213> Artificial											
	<220>											
	<223> péptido											
20	<400> 64											
				Phe	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Cys	Arg
				1				5				
	<210> 65											
	<211> 9											
25	<212> PRT											
	<213> Artificial											
	<220>											
	<223> péptido											
30	<400> 65											
				Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Cys	Arg	Tyr
				1				5				
	<210> 66											
	<211> 9											
35	<212> PRT											
	<213> Artificial											
	<220>											
	<223> péptido											
40	<400> 66											
				Ala	Gly	Ala	Cys	Arg	Tyr	Gly	Pro	Phe
				1				5				
	<210> 67											
	<211> 9											
45	<212> PRT											
	<213> Artificial											
	<220>											
	<223> péptido											
50	<400> 67											
				Cys	Arg	Tyr	Gly	Pro	Phe	Gly	Pro	Pro
				1				5				
	<210> 68											
	<211> 9											
55	<212> PRT											
	<213> Artificial											
	<220>											
	<223> péptido											
60	<400> 68											

ES 2 691 091 T3

<400> 68
 Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser
 1 5
 <210> 69
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 69
 Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg
 1 5
 <210> 70
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 70
 Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 71
 Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 72
 Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala
 1 5
 <210> 73
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 73
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr
 1 5
 <210> 74
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido

<400> 74
 Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser
 1 5
 <210> 75
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> péptido
 <400> 75
 Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu
 1 5
 <210> 76
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> péptido
 <400> 76
 Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 1 5
 <210> 77
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> péptido
 <400> 77
 Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg
 1 5
 <210> 78
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> péptido
 <400> 78
 Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn
 1 5
 <210> 79
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> péptido
 <400> 79
 Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln
 1 5
 <210> 80
 55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> péptido

ES 2 691 091 T3

<400> 80
 Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr
 1 5
 <210> 81
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 81
 Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr
 1 5
 <210> 82
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 82
 Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val
 1 5
 <210> 83
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 83
 Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe
 1 5
 <210> 84
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 84
 Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 1 5
 <210> 85
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 85
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala
 1 5
 <210> 86
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 60

ES 2 691 091 T3

<p><400> 86</p>	<p>Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe 1 5</p>
<p><210> 87 <211> 9 5 <212> PRT <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> péptido 10</p>	
<p><400> 87</p>	<p>Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn 1 5</p>
<p><210> 88 <211> 9 15 <212> PRT <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> péptido 20</p>	
<p><400> 88</p>	<p>Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe 1 5</p>
<p><210> 89 <211> 9 25 <212> PRT <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> péptido 30</p>	
<p><400> 89</p>	<p>Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys 1 5</p>
<p><210> 90 <211> 9 35 <212> PRT <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> péptido 40</p>	
<p><400> 90</p>	<p>His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met 1 5</p>
<p><210> 91 <211> 9 45 <212> PRT <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> péptido 50</p>	
<p><400> 91</p>	<p>Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln 1 5</p>
<p><210> 92 <211> 9 55 <212> PRT <213> Artificial</p>	
<p><220> <223> péptido</p>	

ES 2 691 091 T3

	<400> 92	Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser
		1 5
5	<210> 93 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
10	<223> péptido	
	<400> 93	Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
		1 5
15	<210> 94 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
20	<223> péptido	
	<400> 94	Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr
		1 5
25	<210> 95 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
30	<223> péptido	
	<400> 95	Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val
		1 5
35	<210> 96 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
40	<223> péptido	
	<400> 96	Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr
		1 5
45	<210> 97 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
50	<223> péptido	
	<400> 97	Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys
		1 5
55	<210> 98 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
60	<223> péptido	

ES 2 691 091 T3

<400> 98	
	Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr
	1 5
<210> 99	
<211> 9	
5 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> péptido	
10 <400> 99	
	Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser
	1 5
<210> 100	
<211> 9	
15 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> péptido	
20 <400> 100	
	Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala
	1 5
<210> 101	
<211> 9	
25 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> péptido	
30 <400> 101	
	Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu
	1 5
<210> 102	
<211> 9	
35 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> péptido	
40 <400> 102	
	Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu
	1 5
<210> 103	
<211> 9	
45 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> péptido	
50 <400> 103	
	Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu
	1 5
<210> 104	
<211> 9	
55 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> péptido	
60	

ES 2 691 091 T3

<400> 104
 Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg
 1 5
 <210> 105
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 105
 Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 106
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 106
 Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr
 1 5
 <210> 107
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 107
 Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn
 1 5
 <210> 108
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 108
 Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu
 1 5
 <210> 109
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 109
 Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr
 1 5
 <210> 110
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido

ES 2 691 091 T3

	<400> 110	
		Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met
		1 5
5	<210> 111	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> péptido	
	<400> 111	
		Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr
		1 5
15	<210> 112	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> péptido	
	<400> 112	
		Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser
		1 5
25	<210> 113	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> péptido	
	<400> 113	
		Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu
		1 5
35	<210> 114	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> péptido	
	<400> 114	
		Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys
		1 5
45	<210> 115	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> péptido	
	<400> 115	
		Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
		1 5
55	<210> 116	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> péptido	

ES 2 691 091 T3

<400> 116
Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp
1 5

<210> 117
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
10

<400> 117
Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
1 5

<210> 118
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
20

<400> 118
Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met
1 5

<210> 119
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
30

<400> 119
Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
1 5

<210> 120
<211> 9
35 <212> **PRT**
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
40

<400> 120
Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys
1 5

<210> 121
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
50

<400> 121
Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
1 5

<210> 122
<211> 9
55 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido
60

ES 2 691 091 T3

<400> 122
Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala
1 5
<210> 123
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido
10 <400> 123
Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
1 5
<210> 124
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido
20 <400> 124
Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val
1 5
<210> 125
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido
30 <400> 125
Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys
1 5
<210> 126
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido
40 <400> 126
Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp
1 5
<210> 127
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido
50 <400> 127
Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser
1 5
<210> 128
<211> 9
55 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido

ES 2 691 091 T3

	<400> 128									
5	<210> 129									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Artificial									
	<220>									
10	<223> péptido									
	<400> 129									
15	<210> 130									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Artificial									
	<220>									
20	<223> péptido									
	<400> 130									
25	<210> 131									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Artificial									
	<220>									
30	<223> péptido									
	<400> 131									
35	<210> 132									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Artificial									
	<220>									
40	<223> péptido									
	<400> 132									
45	<210> 133									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Artificial									
	<220>									
50	<223> péptido									
	<400> 133									
55	<210> 134									
	<211> 9									
	<212> PRT									
	<213> Artificial									
	<220>									
60	<223> péptido									

ES 2 691 091 T3

<400> 134
 His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala
 1 5
 <210> 135
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 135
 Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr
 1 5
 <210> 136
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 136
 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg
 1 5
 <210> 137
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 137
 Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 1 5
 <210> 138
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 138
 Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val
 1 5
 <210> 139
 <211> 9
 45 <212> **PRT**
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 139
 Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe
 1 5
 <210> 140
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 60

ES 2 691 091 T3

<400> 140
 Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg
 1 5
 <210> 141
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 141
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile
 1 5
 <210> 142
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 142
 Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
 1 5
 <210> 143
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 143
 Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg
 1 5
 <210> 144
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 144
 Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg
 1 5
 <210> 145
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 145
 Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val
 1 5
 <210> 146
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido

ES 2 691 091 T3

	<400> 146	Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val
		1 5
5	<210> 147 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
10	<223> péptido	
	<400> 147	Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala
		1 5
15	<210> 148 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
20	<223> péptido	
	<400> 148	Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr
		1 5
25	<210> 149 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
30	<223> péptido	
	<400> 149	Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val
		1 5
35	<210> 150 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
40	<223> péptido	
	<400> 150	Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala
		1 5
45	<210> 151 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
50	<223> péptido	
	<400> 151	Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr
		1 5
55	<210> 152 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	
60	<223> péptido	

	<400> 152	Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys 1 5
5	<210> 153 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido	
10	<400> 153	Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg 1 5
15	<210> 154 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido	
20	<400> 154	Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe 1 5
25	<210> 155 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido	
30	<400> 155	Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met 1 5
35	<210> 156 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido	
40	<400> 156	Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys 1 5
45	<210> 157 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido	
50	<400> 157	Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala 1 5
55	<210> 158 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> péptido	
60		

ES 2 691 091 T3

<400> 158
 Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr
 1 5
 <210> 159
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 10 <400> 159
 Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
 1 5
 <210> 160
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 20 <400> 160
 Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg
 1 5
 <210> 161
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 30 <400> 161
 Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr
 1 5
 <210> 162
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 40 <400> 162
 Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe
 1 5
 <210> 163
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 50 <400> 163
 Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu
 1 5
 <210> 164
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido

ES 2 691 091 T3

	<400> 164	
		Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
		1 5
5	<210> 165	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> péptido	
	<400> 165	
		Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met
		1 5
15	<210> 166	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> péptido	
	<400> 166	
		Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg
		1 5
25	<210> 167	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> péptido	
	<400> 167	
		Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
		1 5
35	<210> 168	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> péptido	
	<400> 168	
		His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys
		1 5
45	<210> 169	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> péptido	
	<400> 169	
		Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
		1 5
55	<210> 170	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> péptido	

ES 2 691 091 T3

```

<400> 170
                    His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys
                    1           5
<210> 171
<211> 9
5  <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
<223> péptido
10 <400> 171
                    Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe
                    1           5
<210> 172
<211> 9
15 <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
<223> péptido
20 <400> 172
                    Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp
                    1           5
<210> 173
<211> 9
25 <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
<223> péptido
30 <400> 173
                    Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg
                    1           5
<210> 174
<211> 9
35 <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
<223> péptido
40 <400> 174
                    Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe
                    1           5
<210> 175
<211> 9
45 <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
<223> péptido
50 <400> 175
                    Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg
                    1           5
<210> 176
<211> 9
55 <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
60 <223> péptido

```


ES 2 691 091 T3

	<400> 182		Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val
			1 5
5	<210> 183		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> péptido		
	<400> 183		His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys
			1 5
15	<210> 184		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> péptido		
	<400> 184		Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe
			1 5
25	<210> 185		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> péptido		
	<400> 185		Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr
			1 5
35	<210> 186		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
40	<223> péptido		
	<400> 186		Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys
			1 5
45	<210> 187		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
50	<223> péptido		
	<400> 187		Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe
			1 5
55	<210> 188		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
60	<223> péptido		

ES 2 691 091 T3

	<400> 194		Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr
			1 5
	<210> 195		
	<211> 9		
5	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> péptido		
10	<400> 195		His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr
			1 5
	<210> 196		
	<211> 9		
15	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> péptido		
20	<400> 196		Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe
			1 5
	<210> 197		
	<211> 9		
25	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> péptido		
30	<400> 197		Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
			1 5
	<210> 198		
	<211> 9		
35	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> péptido		
40	<400> 198		Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg
			1 5
	<210> 199		
	<211> 9		
45	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> péptido		
50	<400> 199		Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp
			1 5
	<210> 200		
	<211> 9		
55	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> péptido		

ES 2 691 091 T3

	<400> 200	
		Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser
		1 5
5	<210> 201	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> péptido	
	<400> 201	
		Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys
		1 5
15	<210> 202	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> péptido	
	<400> 202	
		Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys
		1 5
25	<210> 203	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> péptido	
	<400> 203	
		Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
		1 5
35	<210> 204	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> péptido	
	<400> 204	
		Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala
		1 5
45	<210> 205	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> péptido	
	<400> 205	
		Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg
		1 5
55	<210> 206	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> péptido	

ES 2 691 091 T3

	<400> 206	
		Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser
		1 5
	<210> 207	
	<211> 9	
5	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> péptido	
10	<400> 207	
		Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu
		1 5
	<210> 208	
	<211> 9	
15	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> péptido	
20	<400> 208	
		Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
		1 5
	<210> 209	
	<211> 9	
25	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> péptido	
30	<400> 209	
		Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
		1 5
	<210> 210	
	<211> 9	
35	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> péptido	
40	<400> 210	
		Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His
		1 5
	<210> 211	
	<211> 9	
45	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> péptido	
50	<400> 211	
		Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His
		1 5
	<210> 212	
	<211> 9	
55	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> péptido	
60		

ES 2 691 091 T3

<400> 218
Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu
1 5

5 <210> 219
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido

<400> 219
Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn
1 5 10 15

Met His Gln Arg Asn
20

15 <210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> péptido

<400> 220
Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu
1 5

25 <210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> péptido

<400> 221
Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
1 5

35 <210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> péptido

<400> 222
Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
1 5

45 <210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> péptido

<400> 223
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

55 <210> 224
<211> 9
<212> PRT

ES 2 691 091 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 5
 <400> 224
 Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 225
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 15 <400> 225
 Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 226
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 25 <400> 226
 Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 227
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 35 <400> 227
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val
 1 5
 <210> 228
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 45 <400> 228
 Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 229
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido
 55 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Ser o Ala
 60

ES 2 691 091 T3

<400> 229
 Xaa Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 230
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 10

 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Ser, Ala, Abu, Arg, Lys, Orn, Cit, Leu, Phe y Asn.
 15

 <400> 230
 Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

 <210> 231
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 25

 <400> 231
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5

 <210> 232
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 35

 <400> 232
 Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

 <210> 233
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 45

 <400> 233
 Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

 <210> 234
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido
 55

 <400> 234
 Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val
 1 5

 <210> 235
 <211> 9

ES 2 691 091 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> péptido

<400> 235

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 1 5

10 <210> 236
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> péptido

<400> 236

Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn
 1 5 10

20 <210> 237
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> péptido

<400> 237

Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro
 1 5 10 15

Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu
 20

30 <210> 238
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido

<400> 238

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met
 1 5 10 15

Asn Leu

40 <210> 239
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido

<400> 239

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro
 1 5 10 15

Tyr Leu

50 <210> 240
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

5 <400> 240

Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys
1				5					10						15

Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

20

<210> 241
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido

15 <400> 241

Cys	Tyr	Thr	Trp	Asn	Gln	Met	Asn	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg
1				5					10						15

Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

20

<210> 242
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido

25 <400> 242

Cys	Trp	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Phe	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Tyr
1				5					10						15

Gly Ser Leu

30 <210> 243
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> péptido

35 <400> 243

Trp	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Phe	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gly
1				5					10						15

Ser Leu Cys

40 <210> 244
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> péptido

45 <400> 244

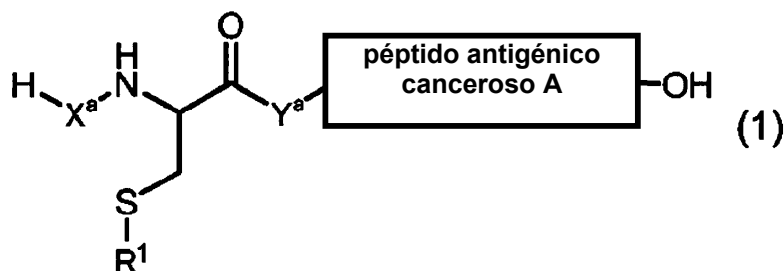
ES 2 691 091 T3

Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly
1 5 10 15

Ser Leu

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (1):



en donde X^a e Y^a son cada uno un enlace sencillo, el péptido antigénico canceroso A es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2),
 ALLPAVPSL (SEQ ID NO: 5),
 SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 6) y
 RVPGVAPTL (SEQ ID NO: 7),

un grupo amino de un aminoácido N-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a Y^a en la fórmula (1), y un grupo carbonilo de un aminoácido C-terminal del péptido antigénico canceroso A se une a un grupo hidroxilo en la fórmula (1),

R¹ es un péptido antigénico canceroso C, el péptido antigénico C tiene una secuencia diferente de la del péptido antigénico A, que es un péptido que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

CMTWNQMNL (SEQ ID NO: 3) y
 CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4),

y un grupo tioéter del residuo de cisteína del péptido antigénico C se une al grupo tioéter en la fórmula (1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (4):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto representado por la fórmula (1) es un compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
 CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
 WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
 CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
 WAPVLDFAAPPASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (4):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (4):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende el compuesto representado por la fórmula (5):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos: WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

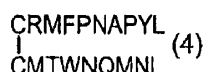
10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 - 9, para su uso en el tratamiento de cáncer que expresa el gen WT1 o cáncer asociado con un aumento en el nivel de expresión del gen WT1.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 - 9, para su uso en la inducción de CTL en la inmunoterapia celular del cáncer.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, para su uso como una vacuna contra el cáncer.

13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el cáncer es cáncer hematológico seleccionado entre leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, o cáncer sólido seleccionado entre cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y tumor cerebral.

14. Una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto representado por la fórmula (4):



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro,
y un compuesto representado por la fórmula (5):

5



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y
al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las
siguientes secuencias de aminoácidos:

10

CNKRYFKLSHLQMHSRK (SEQ ID NO: 22),
CNKRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 23),
CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO: 24),
WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
WAPVLDFAAPPASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

15

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición comprende el compuesto
representado por la fórmula (4):

20



en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

25

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición comprende el compuesto
representado por la fórmula (5):



30

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro.

17. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde la composición
comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
consiste en las secuencias de aminoácidos:

35

WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244),
CWAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 242) y
WAPVLDFAAPPASAYGSLC (SEQ ID NO: 243).

40

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende el compuesto representado por la fórmula
(4):



45

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y
un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos:
WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

50

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende un compuesto representado por la fórmula
(5):



55

en donde el enlace entre C y C es un enlace disulfuro, y
un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos:
WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEQ ID NO: 244).

Fig. 1

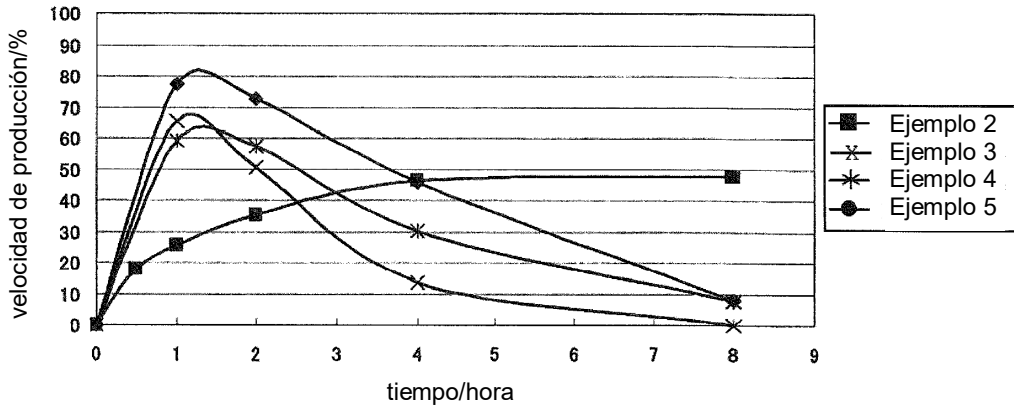


Fig. 2

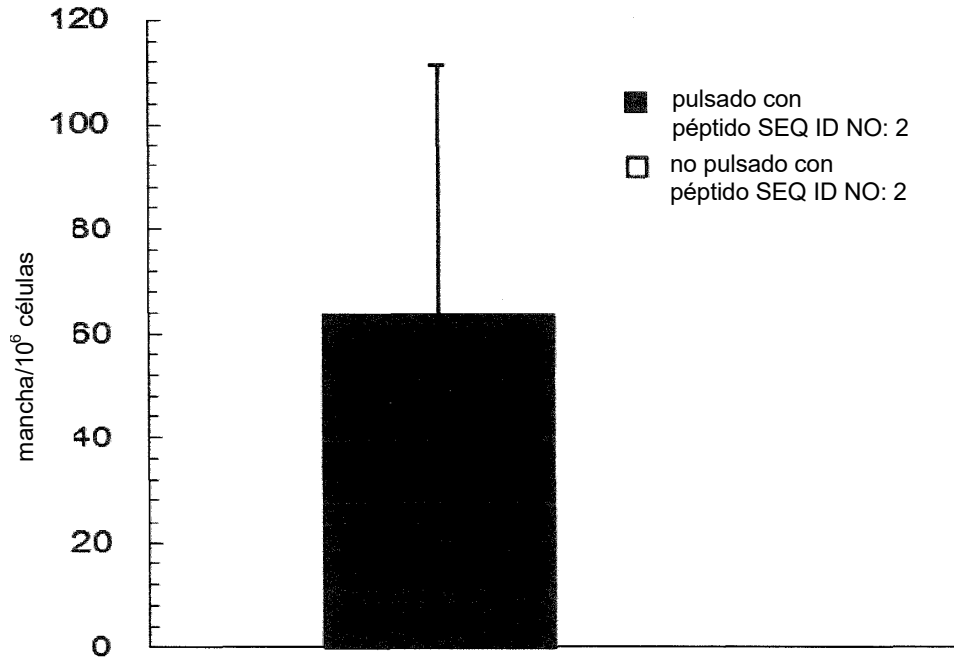


Fig. 3

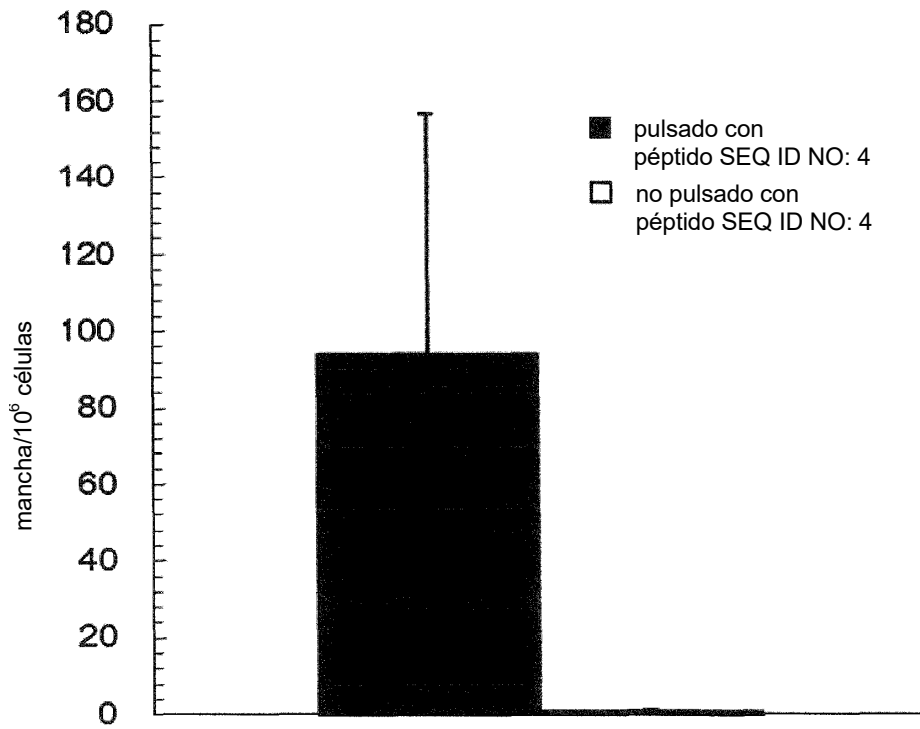


Fig. 4

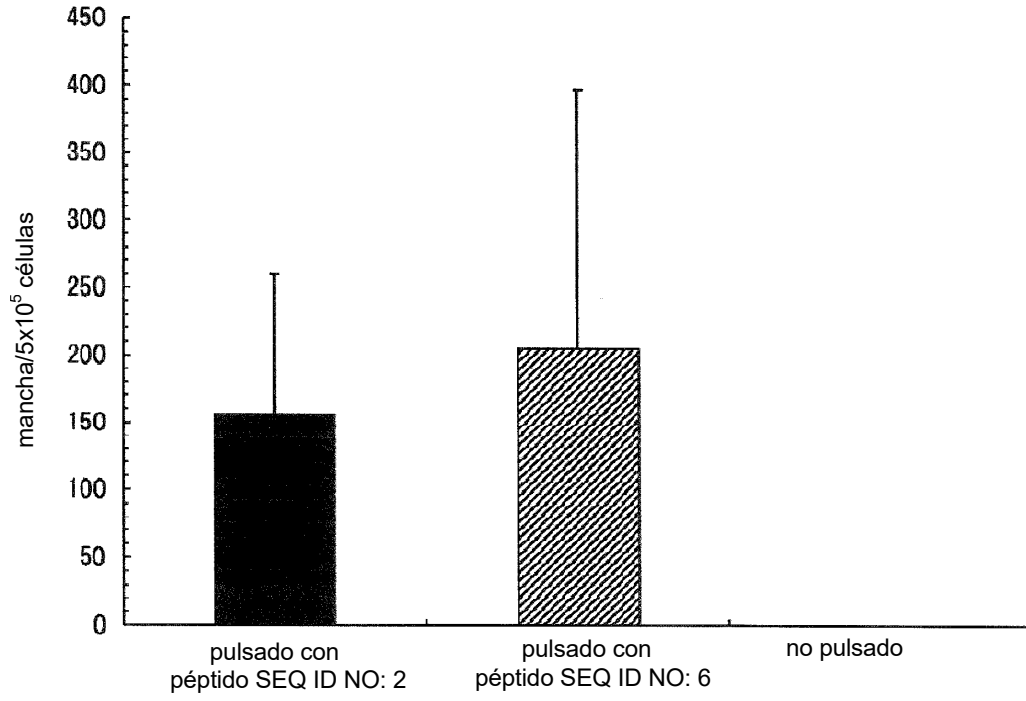


Fig. 5

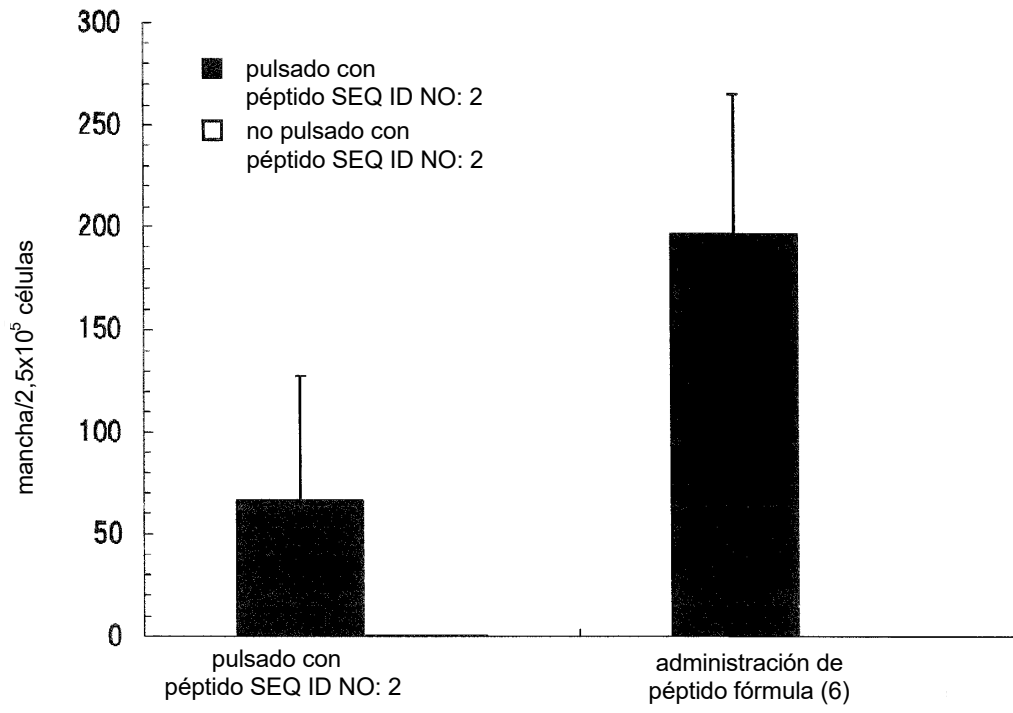


Fig. 6

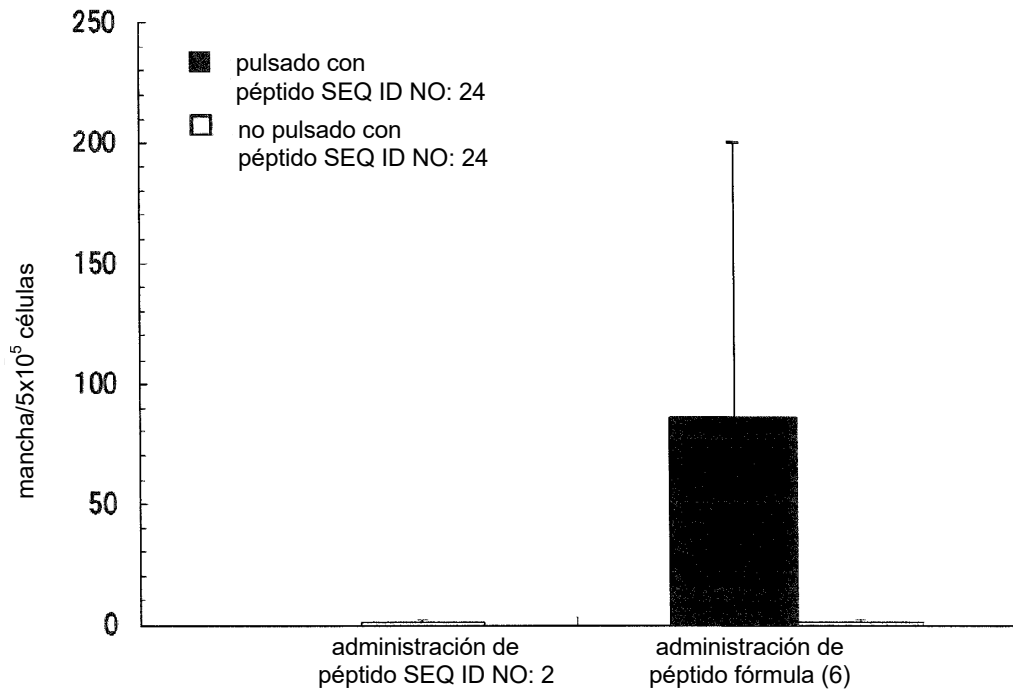


Fig. 7

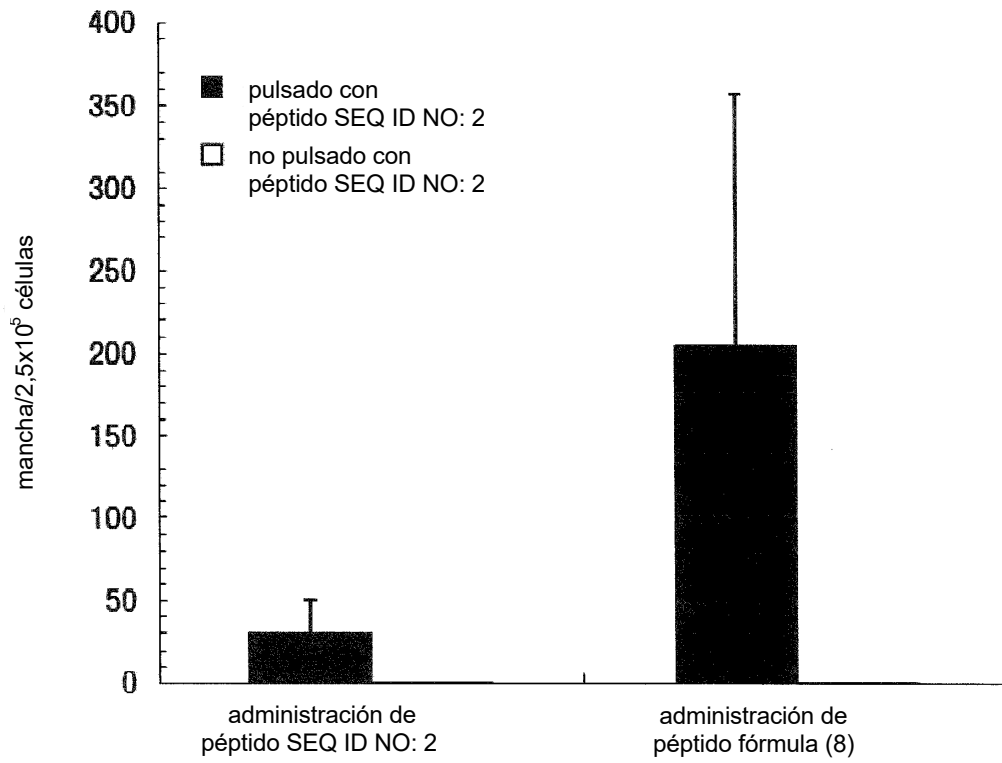


Fig. 8

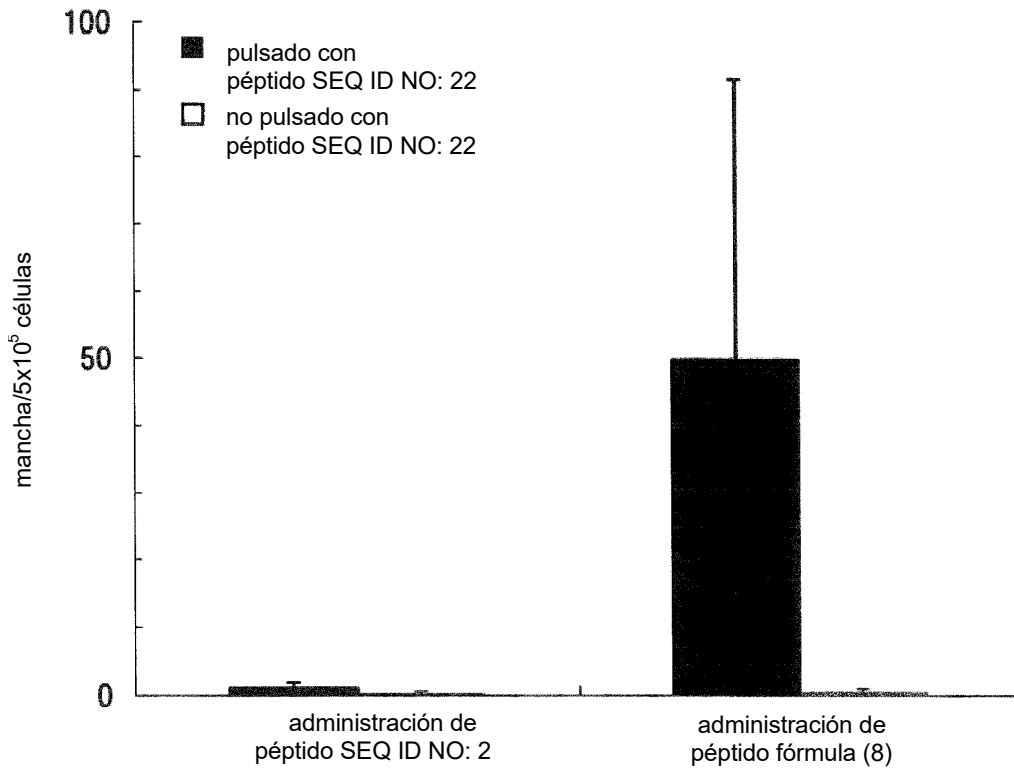


Fig. 9

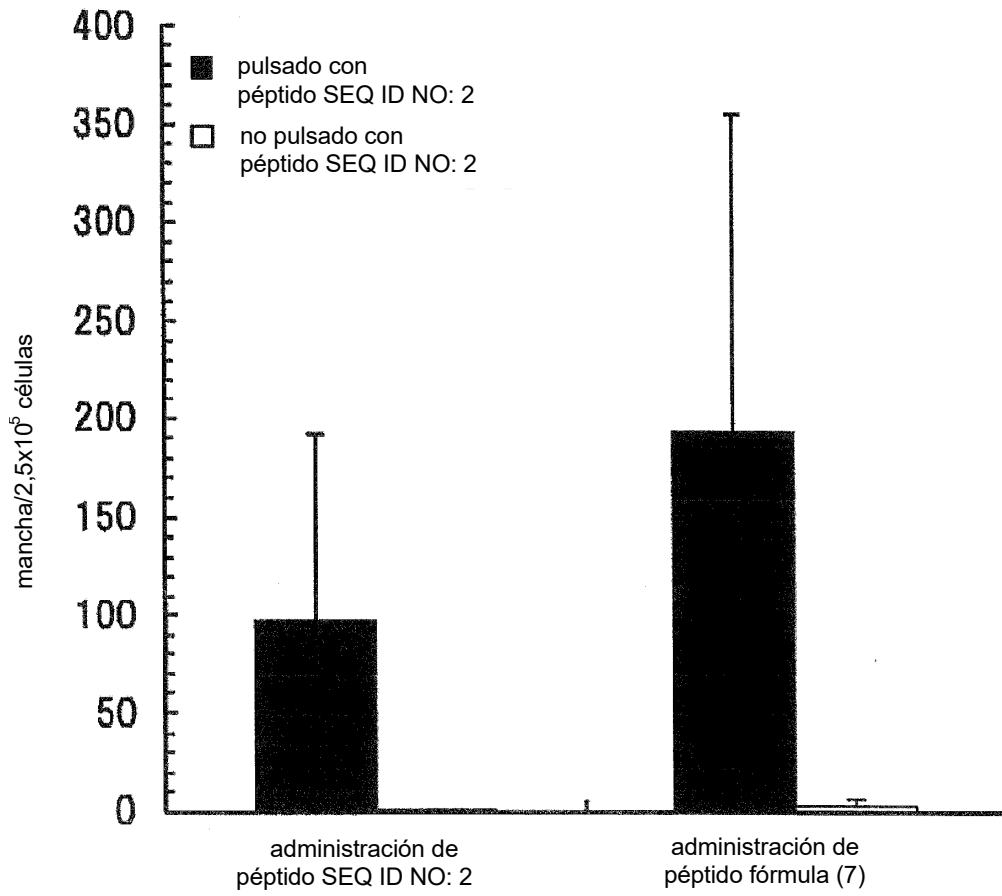


Fig. 10

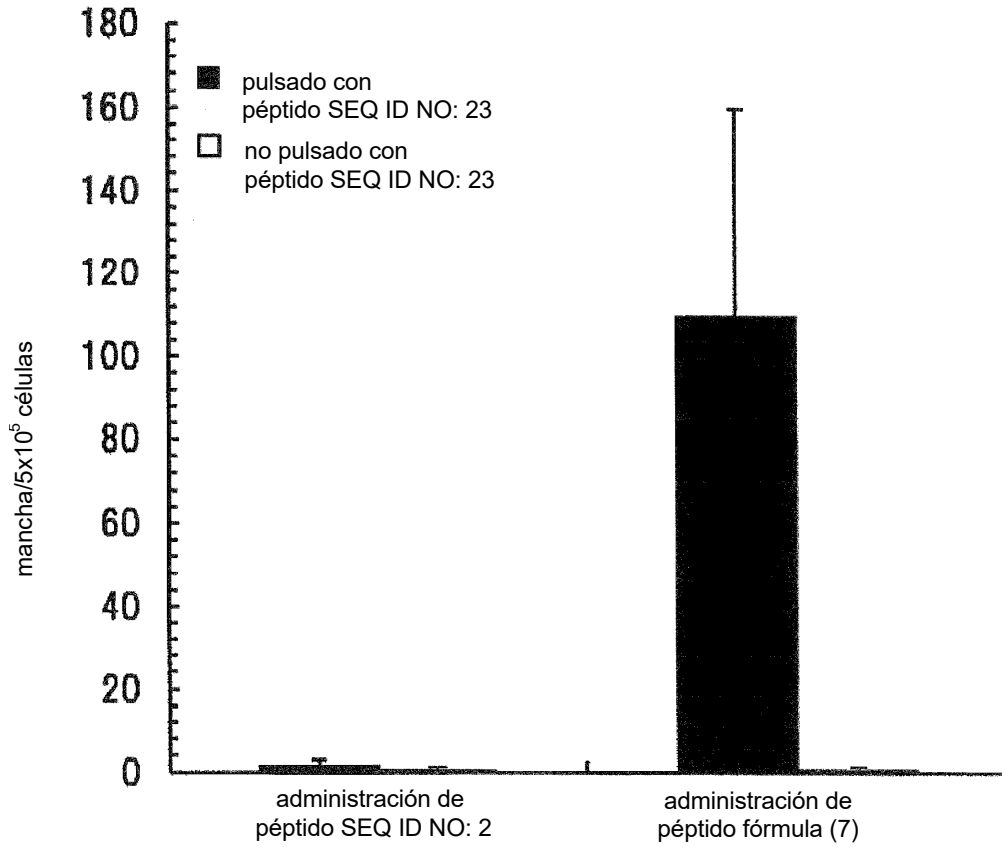


Fig. 11

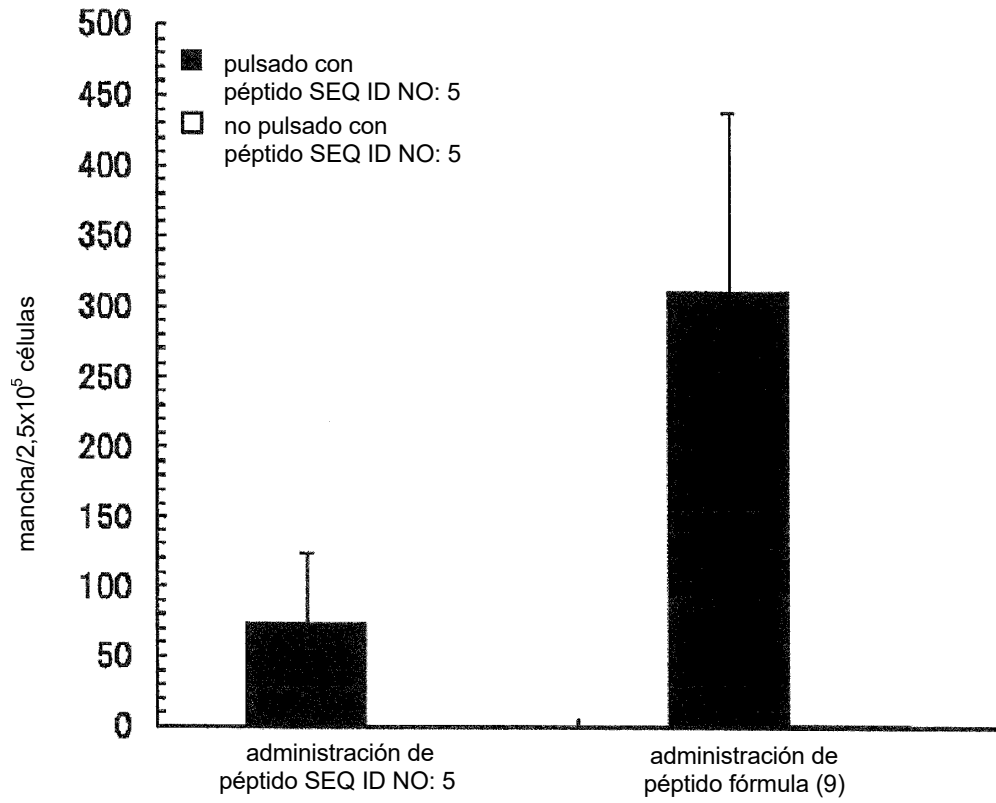


Fig. 12

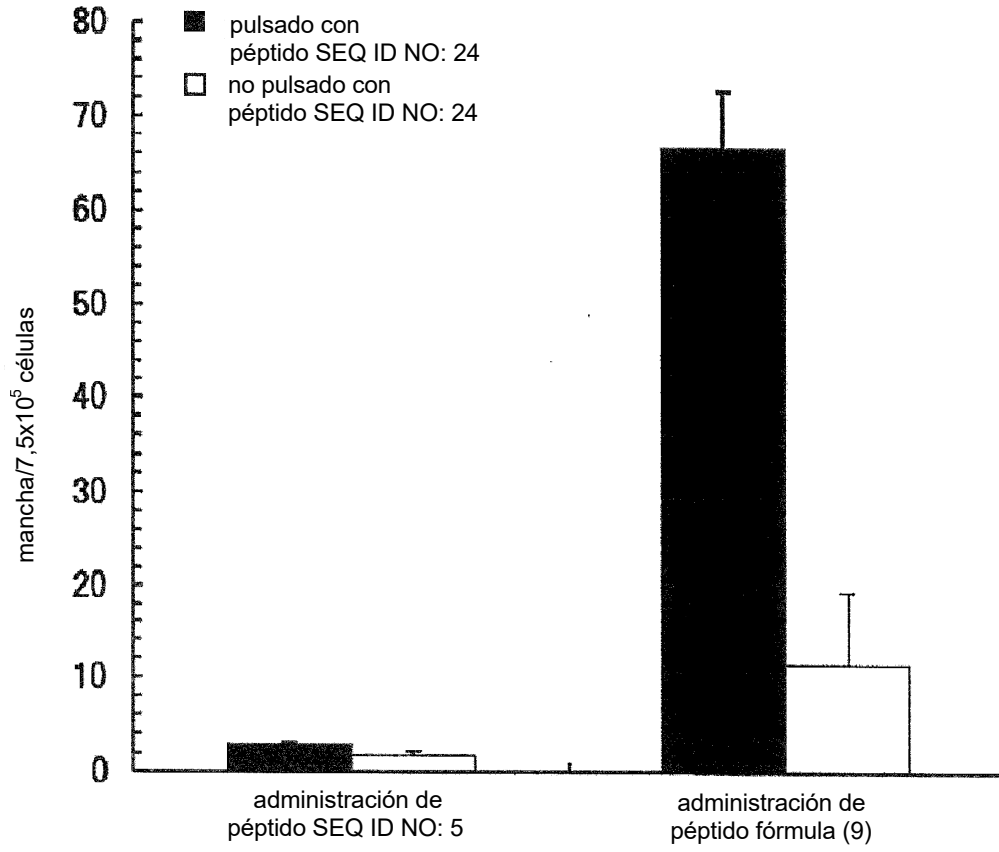


Fig. 13

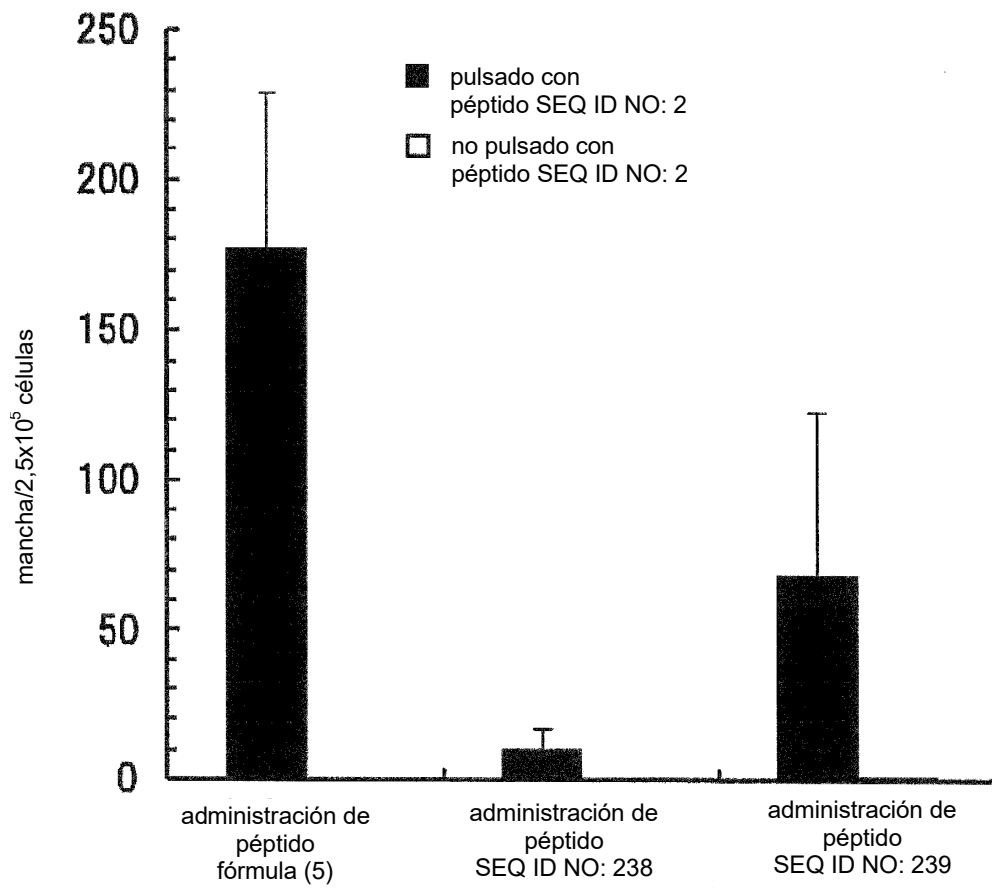


Fig. 14

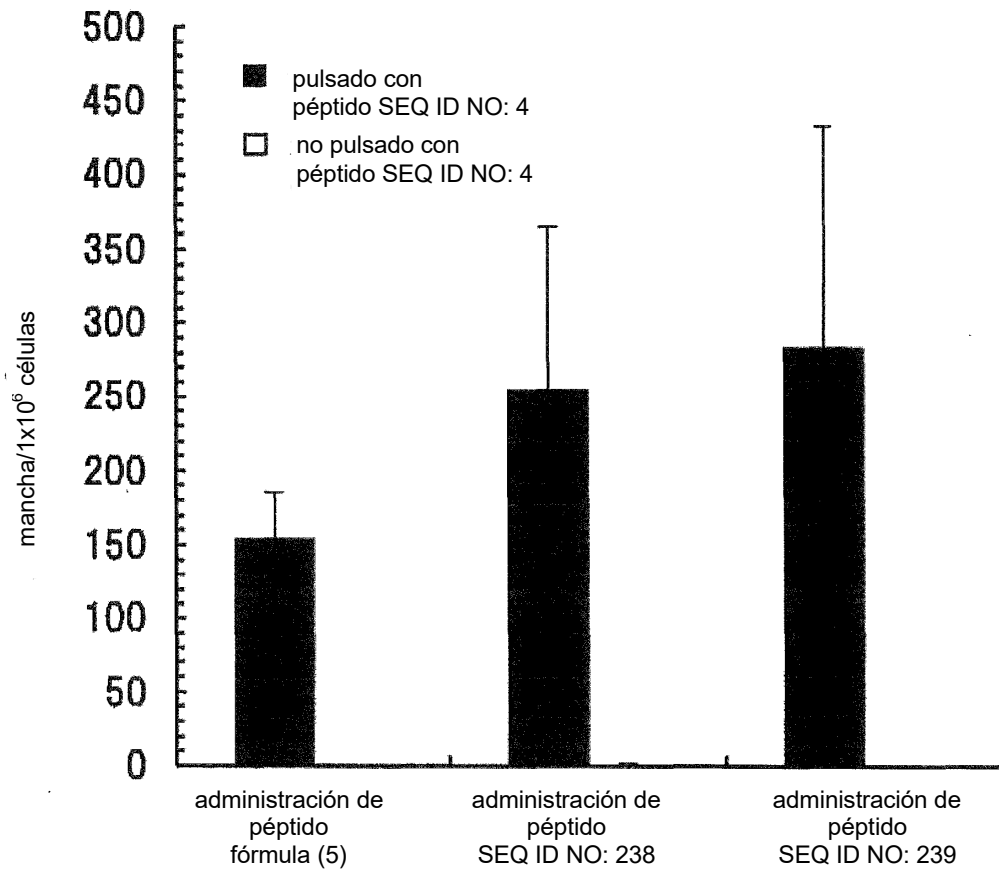


Fig. 15

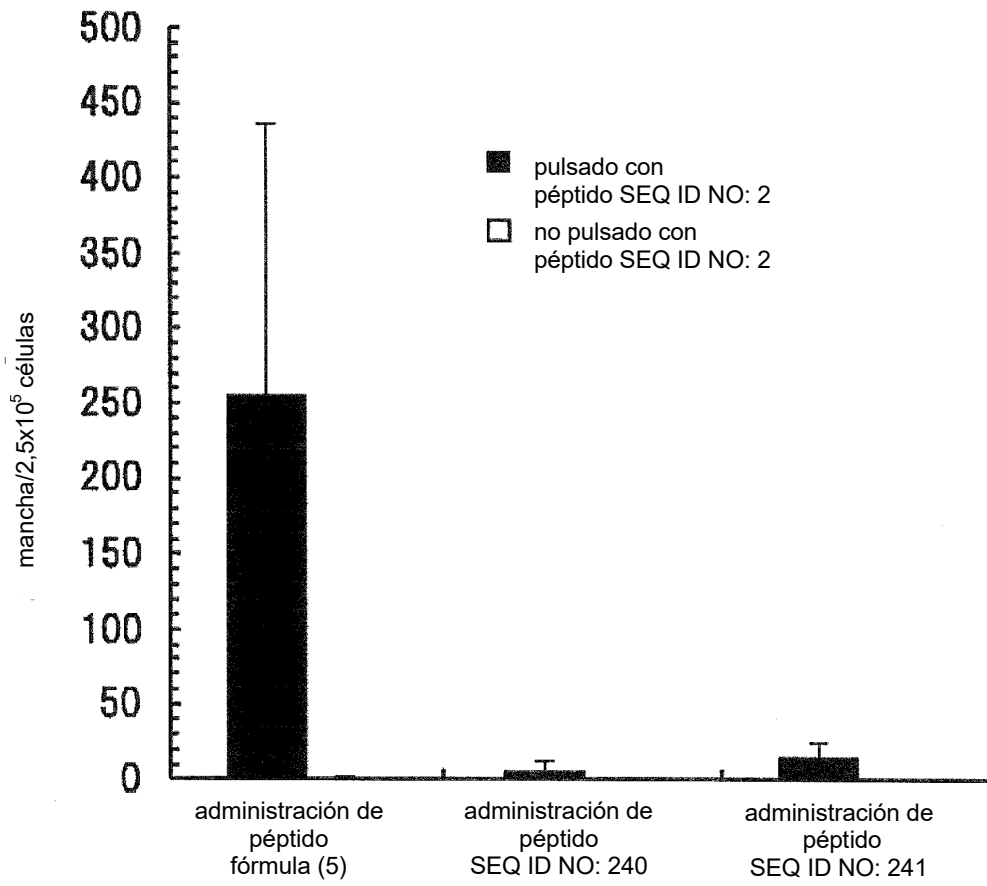


Fig. 16

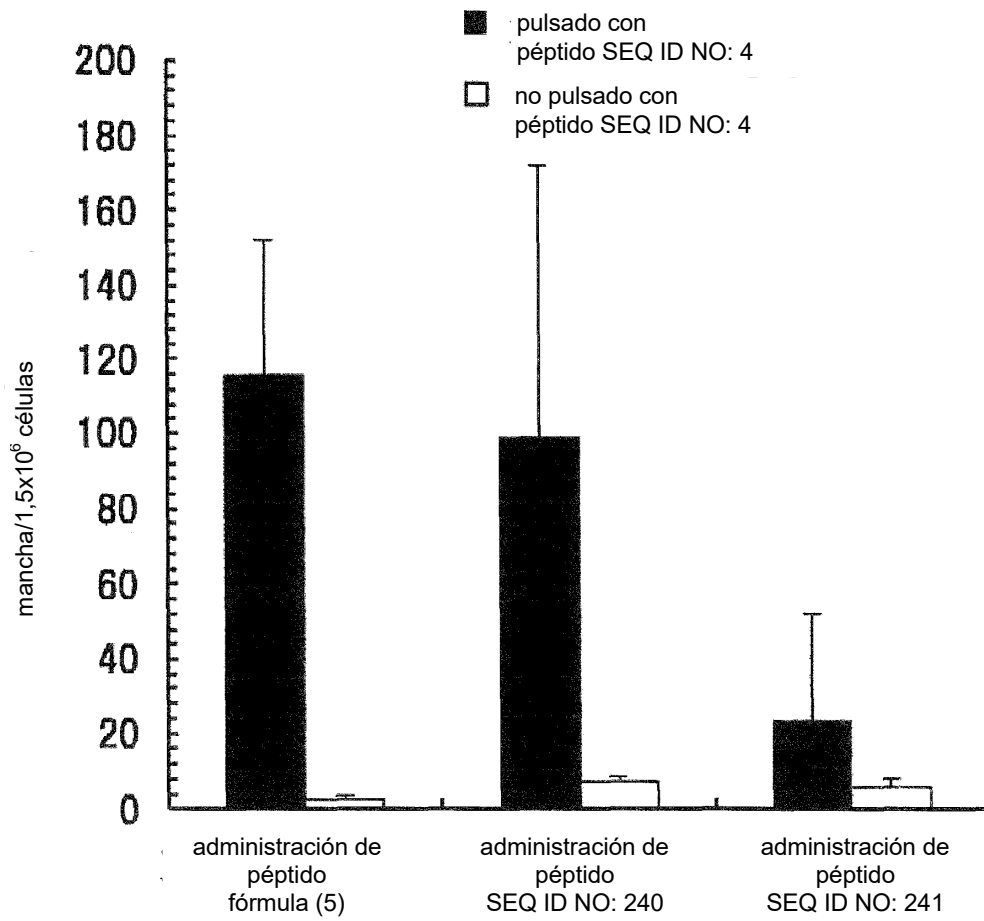


Fig. 17

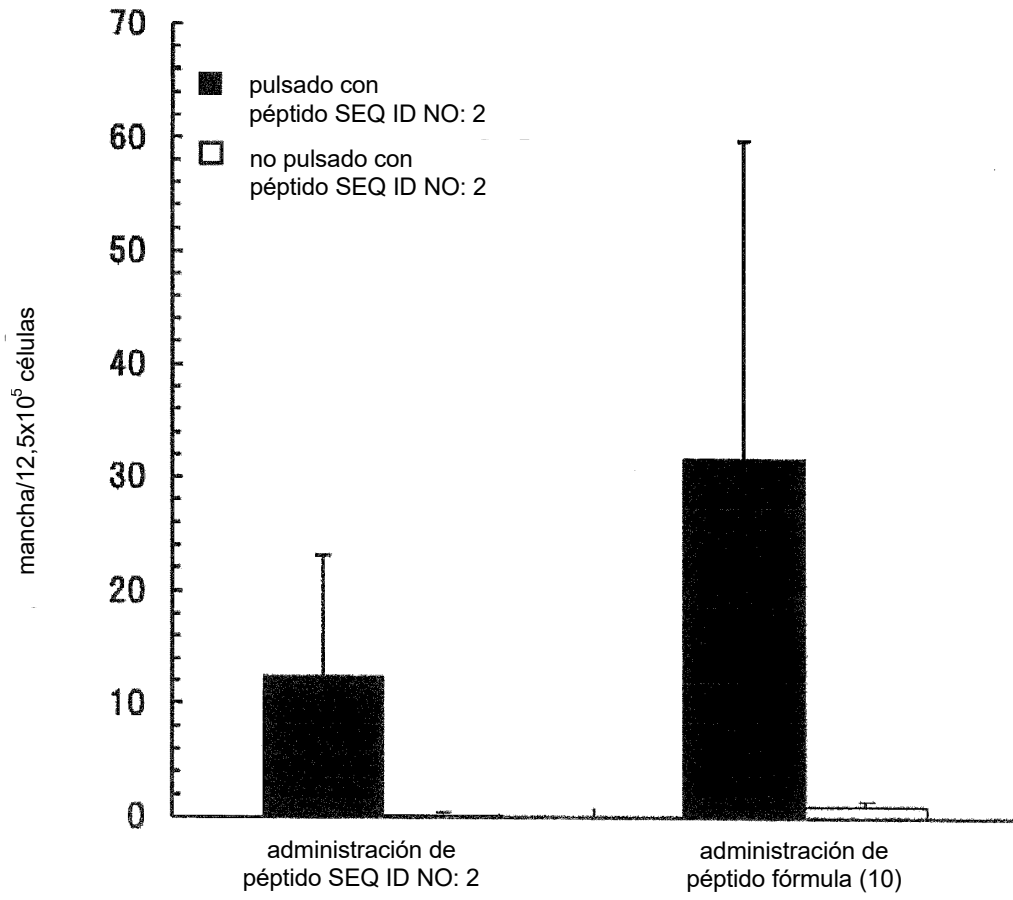


Fig. 18

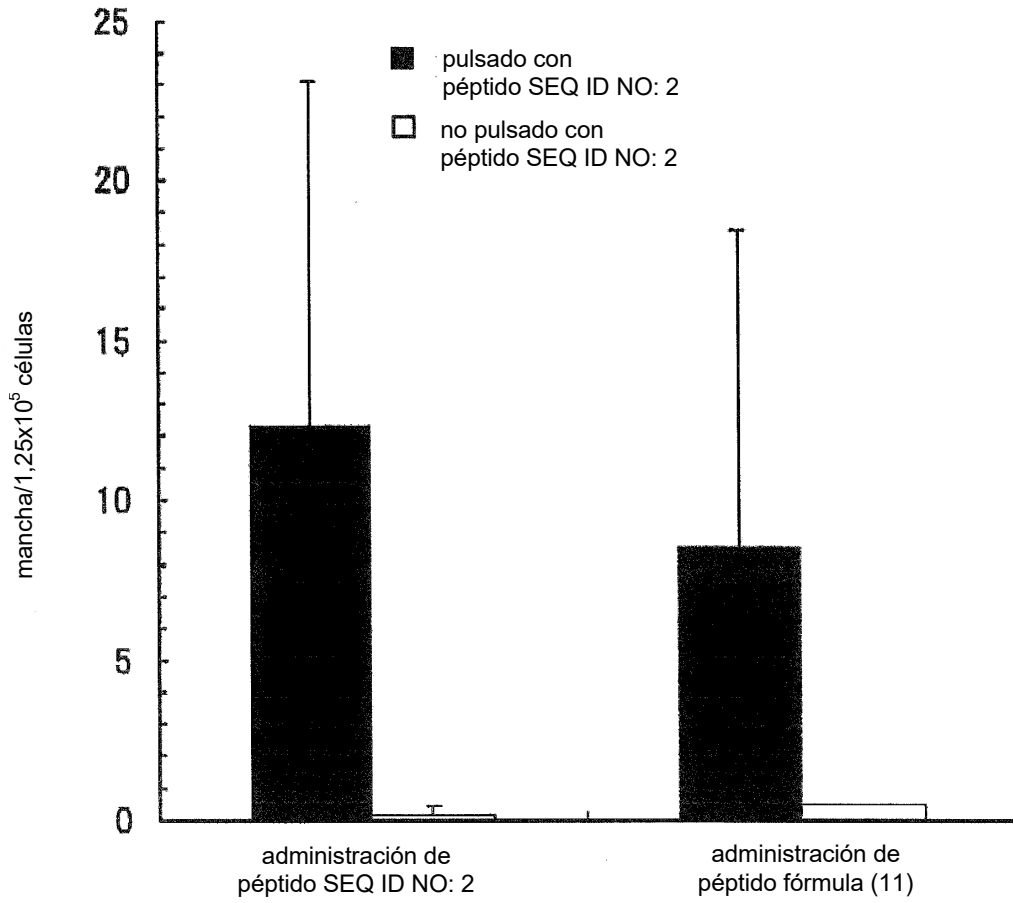


Fig. 19

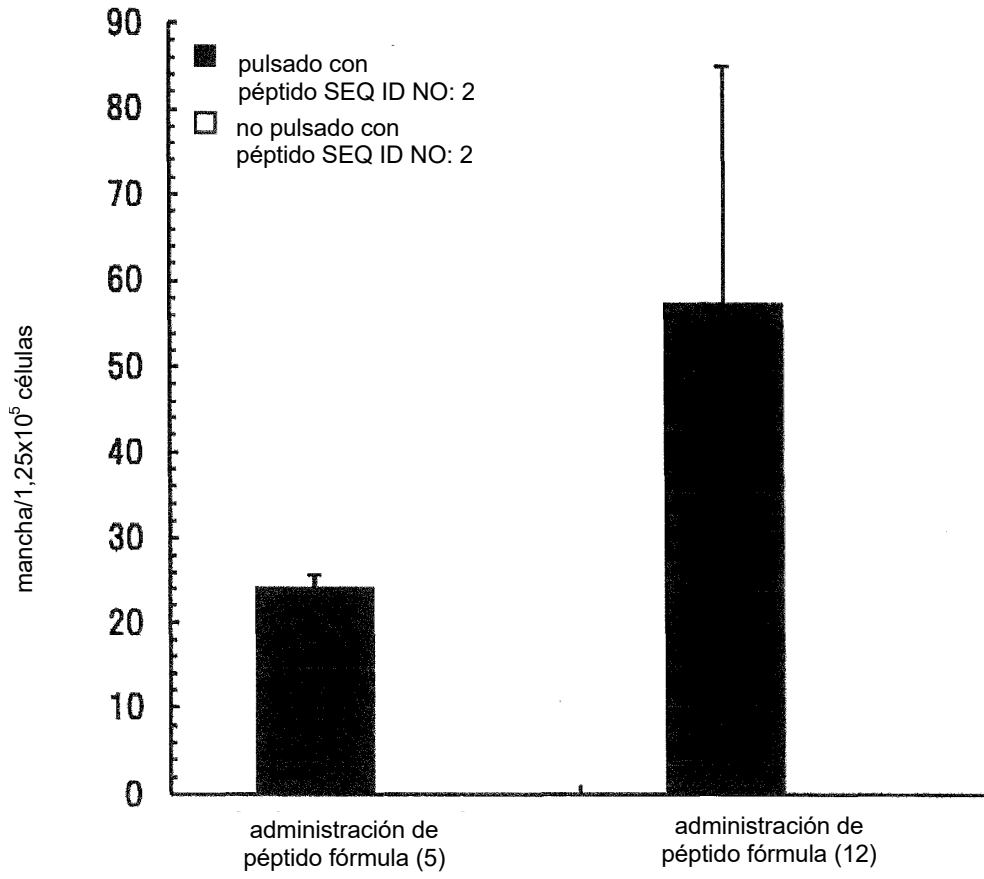


Fig. 20

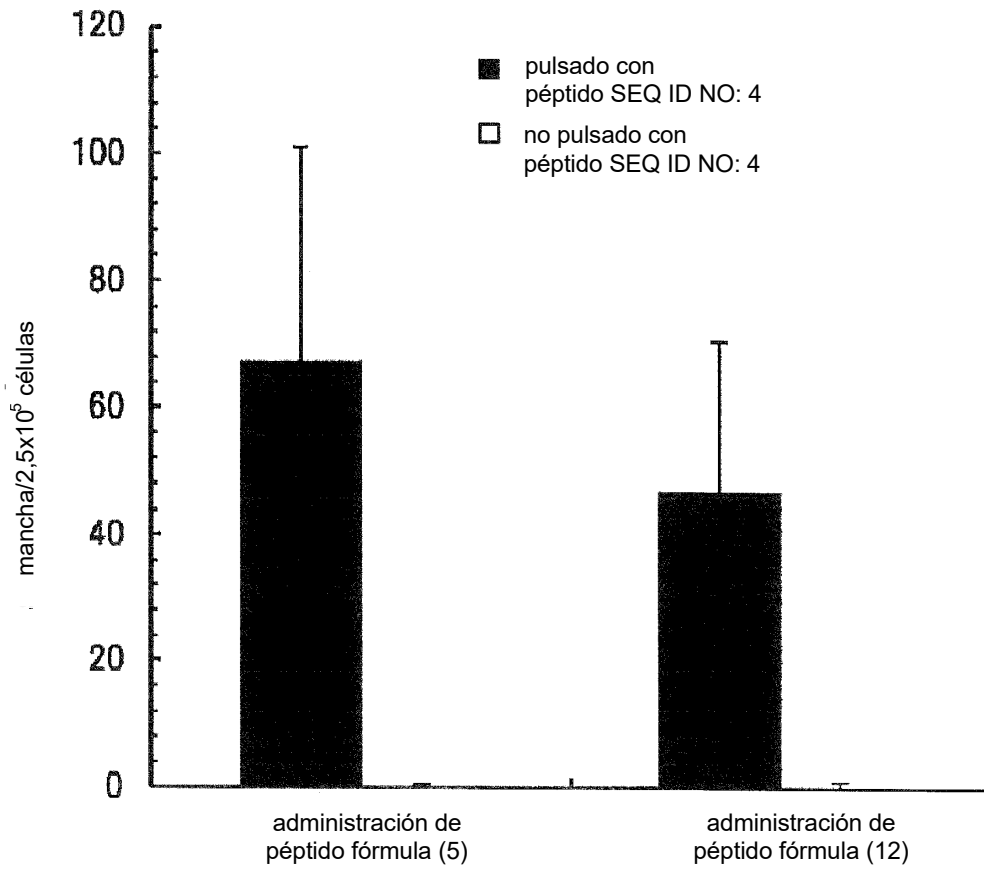


Fig. 21

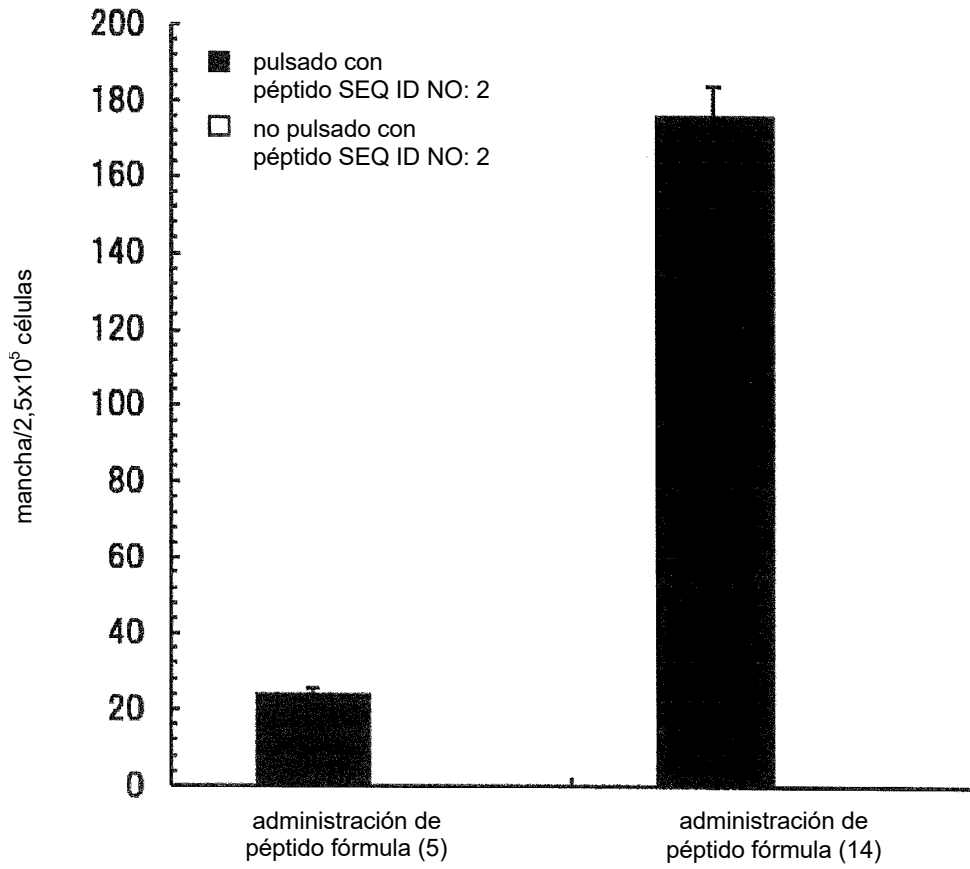


Fig. 22

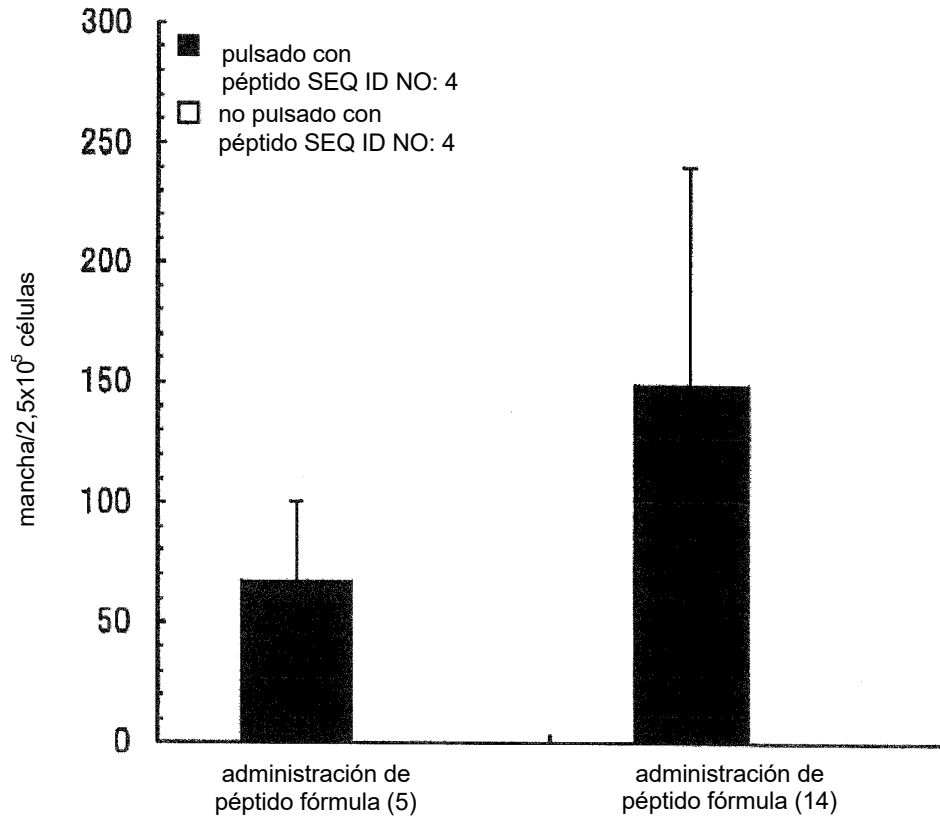


Fig. 23

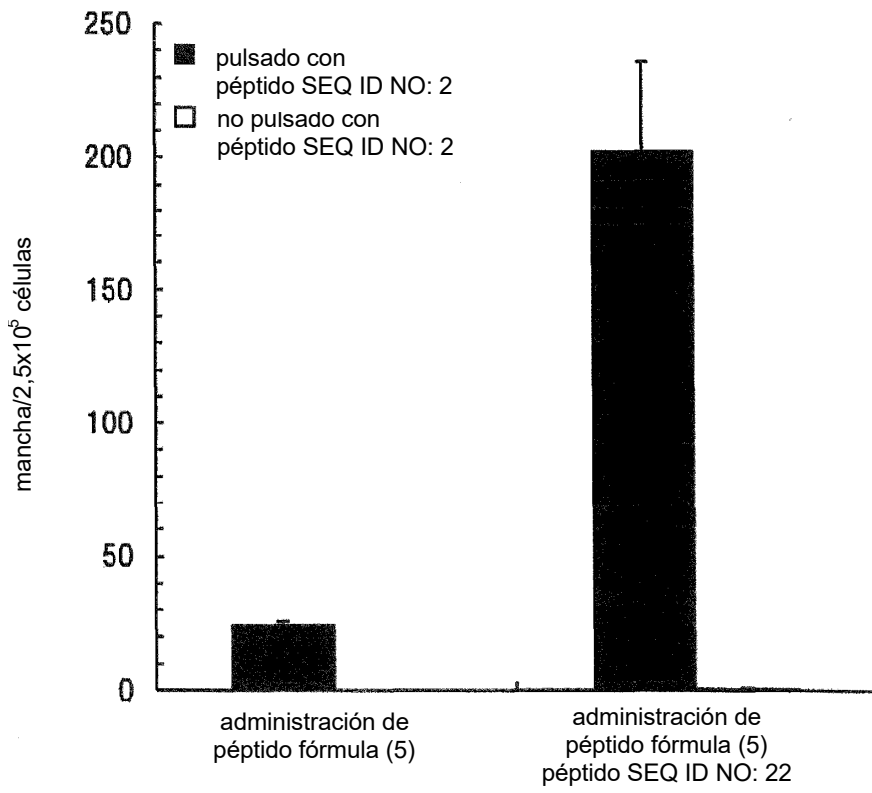


Fig. 24

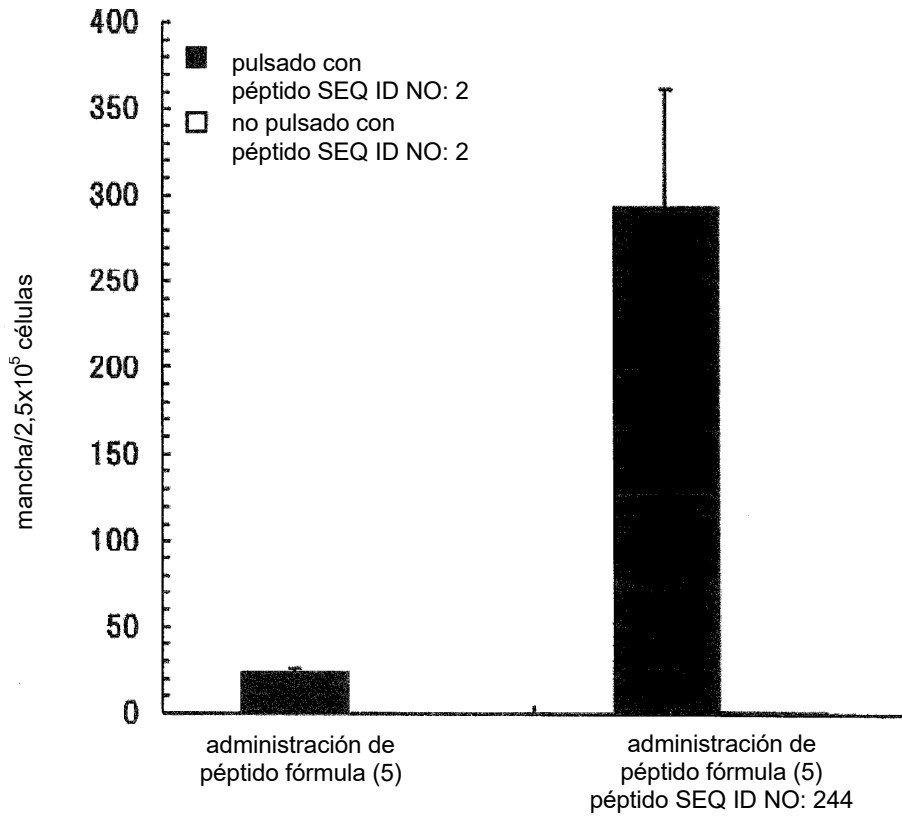


Fig. 25

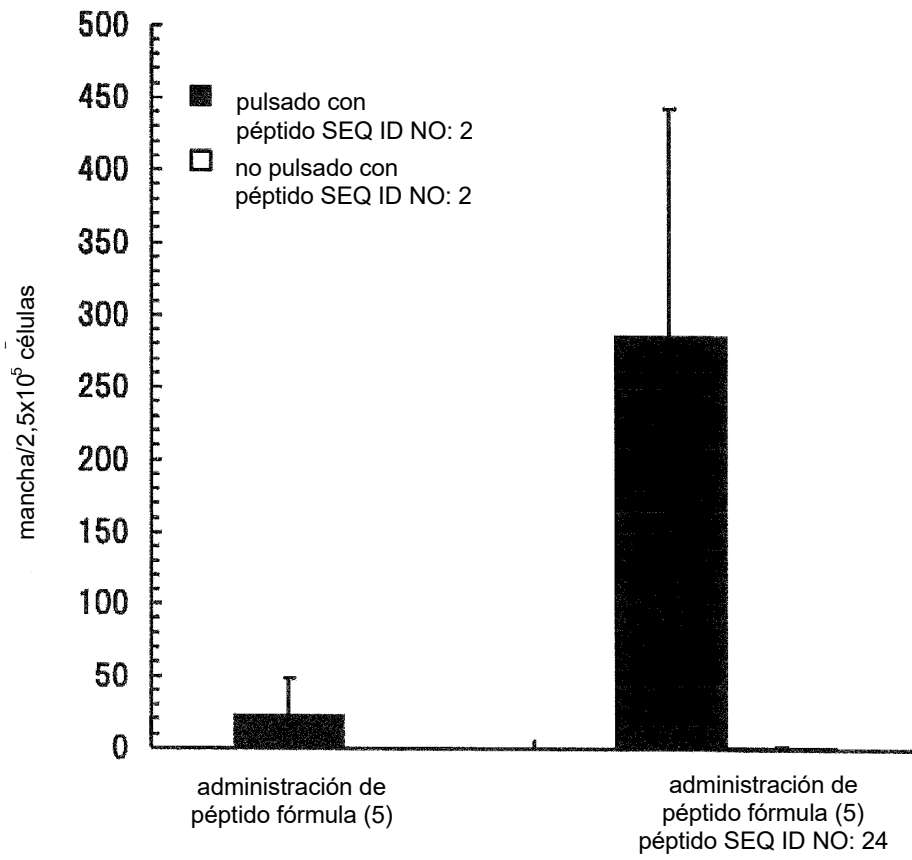


Fig. 26

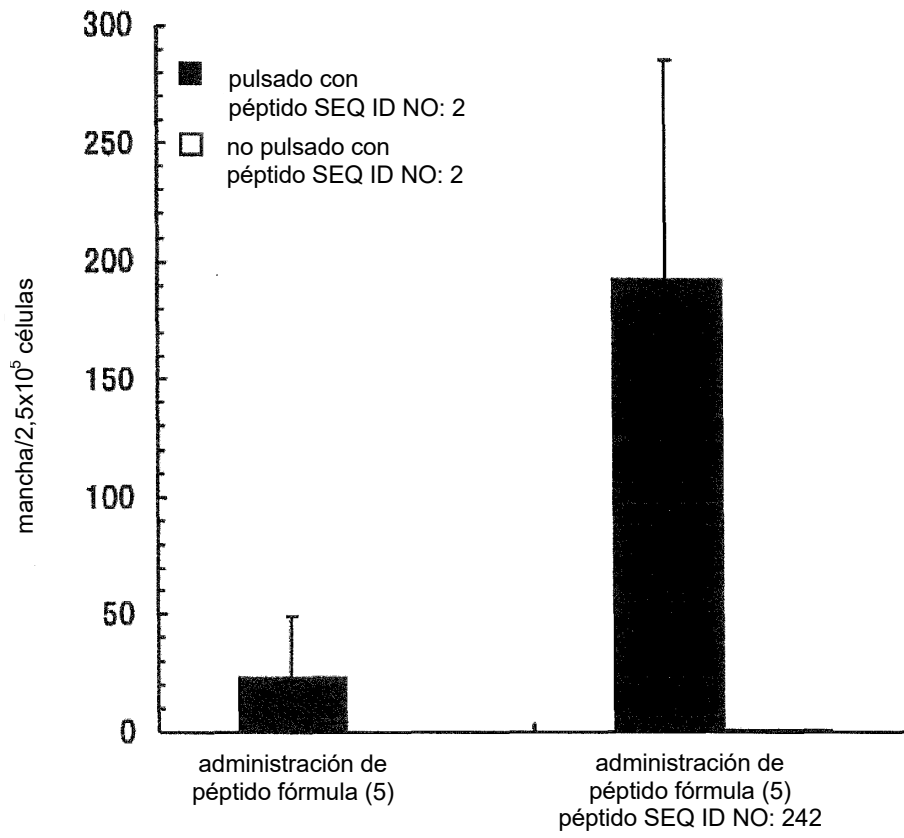


Fig. 27

