

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 535**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2016 PCT/EP2016/065733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2016 E 16734656 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3319625**

54 Título: **Péptidos inmunógenos de preprocalcitonina**

30 Prioridad:

09.07.2015 EP 15176174

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

05.08.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (33.3%)
39, rue Camille Desmoulins
94805 Villejuif Cedex, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MAMI-CHOUAIB, FATHIA y
DURGEAU, AURÉLIE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 777 535 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

Péptidos inmunógenos de preprocalcitonina

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a combinaciones de epítomos de preprocalcitonina (ppCT) y a su uso en inmunoterapia antitumoral.

10 **Estado de la técnica**

La vacunación o inmunoterapia peptídica es un enfoque terapéutico que actualmente es objeto de gran interés en el contexto de la prevención o el tratamiento del cáncer. Su principio se basa en la inmunización con péptidos que reproducen epítomos T de antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T citotóxicos (LTC), que juegan un papel importante en la eliminación de las células cancerosas que expresan estos antígenos en su superficie.

Se recordará que los LTC no reconocen los antígenos proteicos completos, sino fragmentos peptídicos de estos, presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) expresados en la superficie de diferentes células. Son estos fragmentos peptídicos los que constituyen los epítomos T.

La presentación de estos péptidos resulta de un proceso complejo, denominado "cebado del antígeno", que implica 3 etapas principales:

- la degradación citosólica de antígenos por un complejo multienzimático denominado proteasoma;
- la translocación de péptidos como resultado de esta degradación en el retículo endoplasmático (RE) por los transportadores TAP (transportadores asociados al procesamiento del antígeno);
- la asociación de estos péptidos con el CMH para formar complejos estables de péptido/CMH, que se exportarán a la superficie celular.

Los epítomos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I) generalmente tienen de 8 a 11 aminoácidos (aa) y son reconocidos por las células T CD8+, que representan el componente mayor de la respuesta citotóxica. Los epítomos presentados por el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) generalmente tienen de 13 a 18 aminoácidos y son reconocidos por las células T CD4+.

La identificación de estos epítomos constituye una etapa esencial para el desarrollo de composiciones de inmunoterapia antitumoral.

El gen *CALCA* codifica la preprocalcitonina así como la forma alfa de un neuropéptido, el "*calcitonin gene-related peptide*" (α -CGRP) (péptido relacionado con el péptido de la calcitonina). Este gen contiene 5 intrones y 6 exones, y su transcripción primaria es objeto de un corte y empalme alternativo específico de tejido. La unión de los exones 1, 2, 3 y 4 produce el ARNm de la calcitonina en las células C de la tiroides, mientras la de los exones 1, 2, 3, 5 y 6 produce el ARNm del α -CGRP en las neuronas (MORRIS et al., Nature, 308, 746-8, 1984).

El ARNm de la calcitonina codifica un precursor de 141 aminoácidos, la preprocalcitonina, que contiene una secuencia señal N-terminal de 25 restos, cuya escisión produce la procalcitonina, de 116 aa. La procalcitonina comprende una región N-terminal de 57 aa, seguida de la calcitonina madura, de 32 aa, y de un péptido C-terminal de 21 aa, la katacalcina (ROSENFELD et al., Nature, 304, 129-35, 1983). El α -CGRP, en su forma madura, es un péptido de 37 aa, con efecto vasodilatador, encontrado en una gran cantidad de tejidos (ZAIDI et al., Crit Rev Clin Lab Sci, 28, 109-74, 1990). La secuencia señal de la preprocalcitonina también se encuentra en la preprohormona del α -CGRP.

El papel fisiológico de la calcitonina es principalmente la protección del esqueleto durante los períodos de "estrés por deficiencia de calcio", tales como el crecimiento, el embarazo y la lactancia. Las células de los carcinomas medulares de tiroides (CMT) y de ciertos carcinomas pulmonares, también producen calcitonina en cantidades significativas (COOMBES et al., Lancet, 1, 1080-3, 1974; MILHAUD et al., Lancet, 1, 462-3, 1974). Los niveles elevados de calcitonina plasmática son marcadores de diagnóstico y pronóstico en estos tumores.

Se ha propuesto utilizar células dendríticas pulsadas con calcitonina madura para la inmunoterapia de CMT (SCHOTT et al., Cancer Immunol Immunother, 51, 663-8, 2002). Recientemente, el equipo de inventores identificó un péptido antigénico de 10 aminoácidos derivado del péptido señal de la preprocalcitonina. Este péptido corresponde a un epítomo cebado en el retículo endoplasmático, por un mecanismo independiente del proteasoma y de los transportadores TAP (solicitud de patente WO2009010874). La solicitud WO 01/75179 describe la identificación, utilizando un programa informático de predicción de unión con HLA (siglas del inglés *Human Leukocyte Antigen*, antígeno leucocitario humano), de péptidos de la preprocalcitonina potencialmente capaces de unirse a HLA.

Los inventores han identificado ahora otras regiones de la preprocalcitonina involucradas en la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral, y han demostrado que la asociación de diferentes epítomos permite una mejor

respuesta antitumoral.

Objeto de la invención

5 La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

El objeto de la presente invención es una composición que comprende una combinación de secuencias peptídicas seleccionadas entre las siguientes combinaciones:

- 10 - la combinación de secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5 y 6;
 - la combinación de secuencias SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y 6; y
 - la combinación de secuencias SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 6.
- 15 - MGFQKFSPFLALSIL (SEQ ID NO: 1), en lo sucesivo denominada también ppCTI-15;
 - EREGSSLDSPRSKRC (SEQ ID NO: 2), en lo sucesivo denominada también ppCT71-85;
 - GNLSTCMLGTYTQDF (SEQ ID NO: 3), en lo sucesivo denominada también ppCT86-100;
 - FLALSILVL (SEQ ID NO: 4), en lo sucesivo denominada también ppCT9-17;
 - VLLQAGSLHA (SEQ ID NO: 5), en lo sucesivo denominada también ppCT16-25;
 - LLAALVQDYV (SEQ ID NO: 6), en lo sucesivo denominada también ppCT50-59.

20 En una composición según la invención, cada una de dichas secuencias está presente o bien en forma de un péptido de 9 a 15 aminoácidos, o bien incluida en un polipéptido quimérico multiepitópico. En el presente documento un polipéptido quimérico se define como una sucesión de aminoácidos que no está presente en la naturaleza. Un polipéptido quimérico, tal como se entiende en el presente documento, comprende al menos dos secuencias de dicha
 25 combinación de secuencias peptídicas como se definió anteriormente, estando dichas secuencias, en dicho polipéptido, adyacentes, unidas por un elemento enlazador constituido por 1 a 5 aminoácidos, o separadas por una secuencia que comprende un epítipo de una proteína distinta de la preprocalcitonina.

30 Las composiciones según la invención son, por tanto, multiepitópicas, y son, preferentemente, capaces de generar una respuesta poliespecífica, al menos en una parte de los individuos.

Las secuencias SEQ ID NO: 4 y 5 corresponden a un epítipo cebado en el retículo endoplasmático por un mecanismo independiente del proteasoma y de los transportadores TAP. Las secuencias SEQ ID NO: 3 y 6 corresponden a un
 35 epítipo cebado en el retículo endoplasmático por un mecanismo dependiente del proteasoma y de los transportadores TAP. La composición según la invención comprende la secuencia SEQ ID NO: 6, o bien en forma de un péptido constituido por esta secuencia, o bien incluida en un polipéptido quimérico como se definió anteriormente.

Según un modo realización particular de la invención, la composición comprende una mezcla de péptidos de 9 a 15
 40 aminoácidos. Esta mezcla puede liofilizarse o suspenderse en una solución adecuada para uso farmacéutico.

Según otro modo de realización preferido de la invención, la composición comprende un polipéptido quimérico que
 comprende dicha combinación de secuencias peptídicas como se definió anteriormente, estando dichas secuencias
 45 adyacentes, unidas por un elemento enlazador constituido por 1 a 5 aminoácidos, o separadas por una secuencia que comprende un epítipo de una proteína distinta de la preprocalcitonina. En su caso, el polipéptido quimérico puede comprender varias copias de una misma secuencia. Del mismo modo, en un polipéptido quimérico según la invención, al menos una parte de las secuencias inmunógenas puede insertarse en la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (CyA). Como el receptor de CyA es el mismo que el de CD11b, y como las células dendríticas expresan el receptor de CD11b, dicha construcción permite dirigir un epítipo inmunógeno directamente a las células dendríticas (DADAGLIO et al., Int. Immunol, 15, 1423-1430, 2003).

50 La composición según la invención comprende, opcionalmente, al menos otra secuencia peptídica diferente de las secuencias anteriores, en particular una secuencia capaz de unirse a una molécula de HLA, por ejemplo HLA-B7, tal como una de las secuencias SPFLALSIL (SEQ ID NO: 19 o ppCT7-15), EARLLAAL (SEQ ID NO: 20 o ppCT46-54) y/o SPRSKRCGNL (SEQ ID NO: 21 o ppCT79-88), estando dicha secuencia peptídica en forma de un péptido aislado
 55 o incluida en un polipéptido quimérico multiepitópico según la invención.

Para poder utilizarla de manera generalizada en una población cuyos individuos sean portadores de diferentes alelos de HLA, una composición multiepitópica de acuerdo con la invención puede comprender epítopos presentados por
 60 diferentes moléculas de MHC.

Según un modo de realización preferido de la invención, la composición también comprende al menos un inhibidor del
 punto de control inmunitario, tal como, sin limitación, un anti-PD-1, un anti-PDL-1 o un anti-CTLA4, en particular un anticuerpo, preferentemente monoclonal, dirigido contra la molécula PD-1, PDL-1 o CTLA4, preferentemente la molécula hPD-1, hPDL-1 o hCTLA4 humana. Favorablemente, la composición según la invención comprende un anti-
 65 PD-1, en particular, un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, preferentemente anti-hPD-1.

Un polipéptido quimérico según la presente descripción puede obtenerse fácilmente por métodos de por sí conocidos y, en particular, por técnicas convencionales de ADN recombinante.

5 En la figura 1 se muestra la posición de los péptidos de las SEQ ID NO: 1-6 con respecto a la secuencia completa de la preprocalcitonina.

10 Como ejemplos no limitativos de combinaciones de secuencias presentes en una composición según la invención, se mencionarán las combinaciones que comprenden las secuencias anteriores y al menos un inhibidor del punto de control inmunitario como se definió anteriormente, en particular, un anticuerpo monoclonal anti-PD-1, preferentemente un anti-hPD-1 y/o una de las secuencias SEQ ID NO: 19, 20 y/o 21.

15 La presente invención también tiene por objeto una composición que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una mezcla de péptidos inmunógenos o un polipéptido quimérico tales como los definidos anteriormente. Estos polinucleótidos pueden insertarse en un vector de expresión, bajo control transcripcional de un promotor apropiado, para permitir la expresión del péptido inmunógeno o del polipéptido quimérico, según la invención, en una célula o en un organismo hospedador. La elección del vector de expresión depende, en particular, de la célula o del organismo (procariota o eucariota) donde se desee la expresión. Si el polinucleótido se va a administrar directamente a un paciente que se va a tratar, se utilizará, preferentemente, un plásmido de ADN desnudo, o un vector que permita una expresión transitoria, por ejemplo, un vector derivado de un adenovirus o de un virus de la vacuna.

20 Otras composiciones de acuerdo con la invención también pueden comprender células dendríticas, cargadas con un péptido o una composición multiepitópica de la invención, o transformadas con un polinucleótido de la invención, insertado en un vector de expresión apropiado. También pueden comprender células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con un péptido o una composición multiepitópica de la invención. Estas células presentadoras de antígeno artificiales pueden ser en particular vesículas derivadas de células tumorales (texosomas) descritas en la solicitud PCT WO 1999/003499 o exosomas derivados de células dendríticas, como se describe en la publicación de VIAUD et al. (J Immunother, 34, 65-75, 2011).

30 Otro aspecto de la presente invención es el uso como un medicamento de las composiciones descritas anteriormente, en particular como un medicamento destinado a la inmunoterapia antitumoral, más particularmente al tratamiento de tumores que expresan calcitonina y/o α -CGRP. Esto incluye en particular carcinomas pulmonares, microcíticos o no microcíticos, así como carcinomas medulares de la tiroides. Las composiciones según la invención, también pueden utilizarse para el tratamiento de patologías asociadas a un alto nivel en suero de calcitonina o preprocalcitonina o pro α -CGRP, tales como las siguientes patologías neoplásicas: cáncer de riñón, de mama, gastrointestinal (TABOLLI et al, Tumori, 69, 227-230, 1983), de páncreas, de próstata (SIM et al, Ann Clin Lab Sci., 26, 487-95, 1996), de hígado (CONTE et al, Acta Endocrinol, 106, 109-11, 1984) o leucemias mielocíticas crónicas (TAKUBO et al Haematologia, 31, 177-9, 2001), leucemias agudas indiferenciadas y mieloblásticas (KIEFER et al, Leuk Lymphoma., 13, 501-507, 1994), tumores neuroendocrinos y cáncer de hígado (GHILLIANI et al, Cancer Res, 49, 6845-6851, 1989).

40 Una composición según la invención puede utilizarse de una manera particularmente ventajosa para la inmunoterapia de un tumor cuyas células no expresan los transportadores de péptidos TAP.

45 Las composiciones descritas anteriormente son particularmente adecuadas para el tratamiento de un paciente HLA-A*0201.

50 Dichos medicamentos comprenden, como principio activo, una composición según la invención. Dichos medicamentos también pueden comprender excipientes habituales, así como adyuvantes que se utilizan habitualmente en inmunoterapia y que permiten, por ejemplo, favorecer la administración del principio activo, estabilizarlo, aumentar su inmunogenicidad, etc. Como ejemplos de adyuvantes que pueden utilizarse se incluyen los oligodesoxinucleótidos CpG, el factor inductor de apoptosis (AIF, siglas del inglés *Apoptosis-Inducing Factor*), las proteínas de choque térmico (HSP, siglas del inglés *Heat Shock Proteins*), los receptores tipo Toll (TLR, siglas del inglés *Toll-like receptors*) tales como agonistas de TLR3 (Poli I:C) y citocinas y quimiocinas tales como IL-7, IL-12, IL-15 y el GM-CSF y CCL5 (Rantes). Según un modo de realización preferido de la presente invención, dichos medicamentos son vacunas, en particular vacunas terapéuticas.

55 La presente invención se comprenderá mejor con la siguiente descripción complementaria, que se refiere a ejemplos que ilustran la identificación de mezclas de péptidos inmunógenos de acuerdo con la invención.

60 Descripción de las figuras

Figura 1: Posición de péptidos de SEQ ID NO: 1-7 en comparación con la secuencia completa de la preprocalcitonina.

65 Figura 2: Estimulación *in vitro* de CMSP de pacientes con los péptidos de SEQ ID NO: 4-7. A a C: Las CMSP (células mononucleares de sangre periférica) de 9 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) se estimularon con cada uno de los 4 péptidos y después se analizó el número de células CD8+/IFN γ mediante

citometría de flujo. Cada punto (n) corresponde a 8 pocillos de estimulación independientes. La mediana de estos puntos se representa para cada paciente y cada péptido (n = 12). Se indican los aumentos estadísticamente significativos (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

5 Figura 3: Resumen de diferentes combinaciones peptídicas analizadas *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratón transgénico para las moléculas de HLA-A2.

10 Figura 4: Estimulación *in vitro* de CMSP de pacientes con péptidos cortos de 9-10 aa o con las diferentes combinaciones peptídicas. A a C: Las CMSP de los pacientes 3 (A), 10 (B) y 11 (C), se estimularon con uno de los péptidos de las SEQ ID NO: 4 a 6, en solitario, o con una de las combinaciones 1 a 6 descritas en la figura 3; después, el número de células que secretan IFN γ ⁺, se analizó mediante un ensayo ELISPOT (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSpot*: inmunoadsorción ligado a enzimas con formación de manchas). Se indican los aumentos estadísticamente significativos (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

15 Figura 5: Inmunización de ratones transgénicos para las moléculas HLA-A2 con las diferentes combinaciones peptídicas. **A.** Porcentaje de linfocitos T CD8+/IFN γ ⁺ después de la reestimulación *ex vivo* de esplenocitos con cada uno de los péptidos solos o en combinación. **B', B'' y B'''**. Respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8 después de la inmunización de ratones con las diferentes combinaciones peptídicas (C1-C6).

20 Figura 6: Efecto antitumoral de la combinación peptídica C6 en el modelo de ratón transgénico para las moléculas de HLA-A2. El primer día (D0), en el costado de ratones transgénicos, se injertaron, por vía subcutánea, 1x10⁶ células tumorales D122-ppCT. A continuación, los días D0, D3, D4 y D14, los ratones se vacunaron por vía subcutánea, con 100 μ M de cada péptido que componía la combinación C6 y con 25 μ g de adyuvante. El tamaño del tumor se definió mediante la siguiente fórmula: longitud*anchura*profundidad. Se indica la diferencia de crecimiento tumoral estadísticamente significativa (*p<0,05).

30 Figura 7: Potenciación de la respuesta antitumoral y del control del crecimiento tumoral mediante inmunoterapia combinada. **A.** La terapia combinada optimiza el control del crecimiento tumoral. Ratones *NOD-scid Il2r^{nu/nu}* (NSG) recibieron en el costado un injerto de fragmentos de tumor Heu-nIR, y después, una transferencia adoptiva de CMSP humanas de donantes sanos el D10, seguido de una vacunación intravenosa con la vacuna basada en la mezcla de péptidos C6, el D11, combinada o no con un anticuerpo monoclonal anti-PD1 a partir del D12. El crecimiento tumoral se registró cada dos días hasta el final del experimento. **B.** Los ratones tratados con la terapia combinada (vacuna + anti-PD-1) mostraron mayor reducción en el peso del tumor, en comparación con los ratones tratados con la vacuna sola (*p <0,04) o con el anti-PD-1 solo (*p <0,03). **C.** Producción de citocinas inducida por la terapia combinada *in vivo*. Los niveles plasmáticos de IFN- γ humano en el suero de los ratones tratados o no tratados, se determinaron mediante un ensayo ELISA antes de finalizar el experimento (*p <0,01). **D.** Producción de IFN- γ , granzima B (GrmB) y perforina (Perf) por los esplenocitos de ratones tratados y no tratados. Las células T CD8+ que producían IFN- γ , granzima B (GrmB) y perforina (Perf), se evaluaron mediante análisis de fluorescencia intracelular. Los valores corresponden a la intensidad de fluorescencia media (IFM). *p < 0,05; **p < 0,001. Las barras de error representan el error estándar de la media (EEM).

45 Figura 8: Potenciación del control del crecimiento tumoral mediante inmunoterapia combinada. **A.** La terapia combinada optimiza el control del crecimiento tumoral. Ratones *NOD-scid Il2r^{nu/nu}* (NSG) recibieron en el costado un injerto de fragmentos de tumor Heu-nIR, y después, una transferencia adoptiva de CMSP humanas de donantes sanos el D10, seguido el D11 de una vacunación intravenosa con la vacuna basada en la mezcla de péptidos C6a, combinada o no con un anticuerpo monoclonal anti-PD1 a partir del D12. El crecimiento tumoral se registró cada dos días hasta el final del experimento. **B.** Los ratones tratados con la terapia combinada (vacuna + anti-PD-1) mostraron mayor reducción en el peso del tumor, en comparación con los ratones tratados con el anti-PD-1 solo.

50 Descripción detallada de la invención

EJEMPLO 1: ESTIMULACIÓN *IN VITRO* DE CMSP DE PACIENTES CON PÉPTIDOS DE 9 O 10 AMINOÁCIDOS DE PREPROCALCITONINA.

55 MATERIAL Y MÉTODOS

Péptidos

Se seleccionaron los siguientes péptidos:

60 ppCT9-17 FLALSILVL (SEQ ID NO:4);
 ppCT16-25 VLLQAGSLHA (SEQ ID NO:5);
 ppCT50-59 LLAALVQDYV (SEQ ID NO:6);
 ppCT91-100 CMLGTYTQDF (SEQ ID NO:7).

65 Células utilizadas y estimulación

5 CMSP (*células mononucleares de sangre periférica*) de 11 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) se aislaron de sangre periférica por gradiente de Ficoll. Para cada péptido, las CMSP se estimularon 2 veces (D0 y D7) con 20 μ M de péptido. Las CMSP se cultivaron durante 2 semanas en placas de 96 pocillos, a razón de 20 millones de células/placa, en medio completo (RPMI1640, SAB al 10 %, piruvato de sodio al 1 %, penicilina/estreptavidina al 0,1 %) en presencia de IL-2 (20 UI/ml) + IL-4 (10 ng/ml) + IL-7 (10 ng/ml).

Análisis mediante citometría

10 Después de 15 días, las CMSP se estimularon nuevamente con 2,5 μ M del péptido utilizado durante la primera etapa de estimulación, en presencia de 100 μ g/ml de Brefeldin A y se incubaron durante 6 horas a 37° C, con CO₂ al 5 %. Después, las células se incubaron durante 20 min. con un anticuerpo anti-CD8-APC, se lavaron en PBS, se fijaron con PBS-formaldehído al 2 % y se permeabilizaron con BSA/saponina. A continuación se incubaron con un anticuerpo anti-IFN γ conjugado con ficoeritrina (PE). El análisis se realizó mediante citometría de flujo. El estudio estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney y se indican los aumentos estadísticamente significativos (*p <0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

RESULTADOS

20 Los resultados se ilustran en la Figura 2.

El análisis mediante citometría de flujo de la respuesta a la estimulación con los diferentes péptidos de 9 o 10 aminoácidos, permitió mostrar que la estimulación con los péptidos ppCT9-17, ppCT16-25, ppCT50-59 y ppCT91-100 permite un aumento de 1 a 4,5 veces el nivel basal de linfocitos T CD8+/IFN γ T⁺ en los pacientes que se analizaron. 25 El análisis de estimulación de los diferentes pocillos ha permitido demostrar que este aumento de la respuesta de CD8 es estadísticamente significativo (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005). No obstante, los diferentes pacientes no responden de la misma manera a cada uno de los péptidos. Los linfocitos T CD8 de los pacientes 1, 2; 6, 8 y 9 desencadenan una secreción de IFN γ después de la estimulación del conjunto de péptidos analizados, mientras que en los pacientes 4, 5 y 7 solo se desencadena una respuesta linfocitaria después de la estimulación con los péptidos ppCT9-17 y 30 ppCT50-59 y en el paciente 3 se desencadena una respuesta con los péptidos ppCT50-59 y ppCT91-100.

En conclusión, parece que los péptidos son inmunógenos según los pacientes analizados y permiten una respuesta inmunitaria a través de los linfocitos T CD8. Dada la variabilidad de la respuesta a los diferentes péptidos, sería más probable que una combinación peptídica indujera una respuesta anti-ppCT en la mayoría de los pacientes incluidos. 35

EJEMPLO 2: ESTIMULACIÓN *IN VITRO* DE PACIENTES CON LOS PÉPTIDOS CORTOS DE 9 A 10 AA O CON LAS DIFERENTES COMBINACIONES PEPTÍDICAS

MATERIAL Y MÉTODOS

40

Péptidos

Se seleccionaron los siguientes péptidos:

45 ppCT1-15: MGFQKFSPFLALSIL (SEQ ID NO: 1);
ppCT71-85: EREGSSLDSPRSKRC (SEQ ID NO: 2);
ppCT86-100: GNLSTCMLGTYTQDF (SEQ ID NO: 3);
ppCT9-17 FLALSILVL (SEQ ID NO:4);
ppCT16-25 VLLQAGSLHA (SEQ ID NO:5);
50 ppCT50-59 LLAALVQDYV (SEQ ID NO:6);
ppCT91-100 CMLGTYTQDF (SEQ ID NO:7).

Células utilizadas y estimulación

55 CMSP (*células mononucleares de sangre periférica*) de 3 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico se aislaron de sangre periférica por gradiente de Ficoll, después, se estimularon 2 veces (D0 y D7) con 20 μ M de cada uno de los péptidos o con las combinaciones equimolares de cada péptido a 20 μ M descritas en la figura 3. Las CMSP se cultivaron durante 2 semanas en placas de 96 pocillos, a razón de 20 millones de células/placa, en medio completo (RPMI1640, SAB al 10 %, piruvato de sodio al 1 %, penicilina/estreptavidina al 0,1 %) en presencia de IL-2 (20 UI/ml) + IL-4 (10 ng/ml) + IL-7 (10 ng/ml). 60

Análisis mediante ELISPOT

65 Después de 15 días, las CMSP se recuperaron y se incubaron en placas ELISPOT a razón de 100 000 células por pocillo, en presencia de medio con 2,5 μ M de cada péptido o con las combinaciones equimolares de 2,5 μ M de cada péptido utilizado para la estimulación. Las placas se incubaron durante 15 a 18 horas a 37° C y con CO₂ al 5 %. Las

manchas de IFN γ se revelaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Gen-Probe Diaclone). Las manchas formadas por las células que secretan IFN γ se contaron y se analizaron con el sistema C.T.L Immunospot (Cellular Technology Ltd). El estudio estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney y se indican los aumentos estadísticamente significativos (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005)

5

RESULTADOS

Los resultados se ilustran en la figura 4.

10 El análisis del número de células secretoras de IFN γ después de la estimulación de las CMSP de 3 pacientes con las combinaciones descritas en la figura 3, permitió mostrar que estas diferentes combinaciones permiten estimular y, por tanto, amplificar los linfocitos específicos de estos péptidos. En efecto, se observa un aumento significativo en el número de células secretoras de IFN γ en 3 combinaciones en el paciente 11, en 4 combinaciones en el paciente 10 y en las 6 combinaciones en el paciente 3.

15

Además, las estimulaciones con las combinaciones C2, C5 y C6 también aumentan el número de células que secretan IFN γ en comparación con las estimulaciones con los péptidos solos. Estas respuestas son dependientes del paciente. En efecto, la estimulación de las CMNSP del paciente 3 con las combinaciones C2, C5 y C6 permite aumentar el número de células que secretan IFN γ en 6 veces para C2, 3 veces para C5 y 2 veces para C6, mientras que para el paciente 10, la estimulación de las CMSP solo con la combinación C2 aumenta el número de células que secretan IFN γ en 3 veces y la estimulación de las CMSP del paciente 11 con las combinaciones C5 y C6 permiten aumentar el número de células que secretan IFN γ en 3 veces para C5 y en 2 veces para C6.

20

25 Este resultado demuestra que la combinación de varios péptidos procedentes del antígeno ppCT, permite un aumento de la respuesta inmunitaria desarrollada por los linfocitos T CD8. Además, estos resultados también demuestran el interés que suscita el uso de una combinación peptídica en comparación con los péptidos solos para desencadenar una respuesta inmunitaria en la mayoría de los pacientes.

25

EJEMPLO 3: INMUNIZACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS CON DIFERENTES COMBINACIONES PEPTÍDICAS

30

MATERIAL Y MÉTODOS

Péptidos

35

Se seleccionaron los siguientes péptidos:

ppCT1-15: MGFQKFSPFLALSIL (SEQ ID NO: 1);
 ppCT71-85: EREGSSLDSPRSKRC (SEQ ID NO: 2);
 ppCT86-100: GNLSTCMLGTYTQDF (SEQ ID NO: 3);
 ppCT9-17 FLALSILVL (SEQ ID NO:4);
 ppCT16-25 VLLQAGSLHA (SEQ ID NO:5);
 ppCT50-59 LLAALVQDYV (SEQ ID NO:6);
 ppCT91-100 CMLGTYTQDF (SEQ ID NO:7).

40

45

Células utilizadas

Las líneas celulares tumorales humanas TT (procedente de un tumor medular de la tiroides) e IGR-Heu (aislado del tumor CPNM del paciente Heu), que expresaban el antígeno ppCT, se utilizaron como células diana. La línea K562 (procedente de un paciente con leucemia mielóide crónica) se utilizó como control negativo. La línea Heu-EBV, (procedente de linfocitos B del paciente Heu) se utilizó para determinar la especificidad de la lisis. Después de marcar con ⁵¹Cr, las células Heu-EBV se incubaron con la mezcla equimolar de cada péptido a 20 μ M (descrita en la figura 4).

50

Inmunización de ratones

55

Los ratones transgénicos para las moléculas HLA-A2 se inmunizaron 4 veces (D0, D7, D14 y D21) por vía subcutánea en el costado con 100 μ l de las combinaciones peptídicas que contenían una mezcla equimolar de 100 μ M de cada uno de los péptidos y de un adyuvante (25 μ g de Poli (I:C)) (Figura 4). Veintiocho (28) días después de la primera inyección, los ratones se sacrificaron, y después, se recuperaron los esplenocitos y se cultivaron durante una noche en medio completo (RPMI1640, SVF al 10 %, piruvato de sodio al 1 %, penicilina/estreptavidina al 0,1 %) en presencia de IL-2 (20 UI/ml).

60

Análisis mediante citometría y análisis mediante ensayo de citotoxicidad

65

Al día siguiente, los esplenocitos se estimularon con 2,5 μ M de cada uno de los péptidos, solos o en combinación, en

presencia de 10 µg/ml de Brefeldin A y se incubaron durante 6 horas a 37°C, con CO₂ al 5 %. Después, las células se incubaron durante 20 minutos con un anticuerpo anti-CD8-PE, se lavaron en PBS, se fijaron con PBS-formaldehído al 2 % y se permeabilizaron con BSA/saponina. A continuación se incubaron con un anticuerpo anti-IFNγ-APC. El análisis se realizó mediante citometría de flujo.

5 Para el análisis de la actividad citotóxica, los linfocitos T CD8 se aislaron de los esplenocitos por agotamiento negativo (miltenyi biotech). La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 obtenidos de esta manera, se evaluó mediante un ensayo de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr). Las células diana (descritas en el párrafo anterior) se incubaron durante 1 hora a 37° C en presencia de 20 µM de ⁵¹Cr. Después, las células se lavaron con RPMI antes de cultivarse conjuntamente a 37° C con los linfocitos T CD8 a las relaciones de célula efectora/diana de 50:1, 25:1 y 12:1. Después de 4 horas de incubación, se midió la concentración de ⁵¹C liberado en el sobrenadante de los cocultivos. El porcentaje de lisis se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{(\text{cromo liberado} - \text{cromo liberado mínimo})}{(\text{cromo liberado máximo} - \text{cromo liberado mínimo})} \times 100$$

15 RESULTADOS

El análisis mediante citometría de flujo de los esplenocitos aislados después de la inmunización de los ratones con las combinaciones peptídicas C1 a C6 muestra un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8 que expresan IFNγ (Figura 5A). Este aumento depende de la combinación utilizada, que varía de un factor de cambio de 3 a 13 (4,8 para C1; 3 para C2, 3,4 para C3, 5,5 para C4, 4,3 para C5 y 13,6 para C6). Estos resultados muestran que la inmunización de ratones transgénicos con las diferentes combinaciones peptídicas permite desarrollar respuestas inmunitarias mediante la inducción de linfocitos T CD8.

25 Además, la estimulación *ex vivo* con cada uno de los péptidos resultantes de la combinación, permite demostrar el efecto adicional de las combinaciones. Para la combinación C1, se observa que la respuesta después de la estimulación *ex vivo* aumenta de un factor de cambio de 4,2; 5,2 y 4,6 en comparación con las estimulaciones *ex vivo* por los péptidos ppCT1-15; ppCT71-85 y ppCT86-100 respectivamente. Se puede hacer la misma observación sobre la eficacia de la respuesta inmunitaria a través de los linfocitos T CD8 para el conjunto de las combinaciones. No obstante, ninguna de las combinaciones muestra un efecto sobre el péptido ppCT50-59, debido en particular a la fuerte respuesta que induce de manera natural.

Finalmente, los linfocitos T CD8 generados por las inmunizaciones de los ratones con las combinaciones peptídicas, son capaces de reconocer, y de causar la lisis de manera específica, de las células que expresan el antígeno ppCT, como IGR-Heu y TT (Figura 5B). En efecto, la figura 5B muestra que los linfocitos T CD8 procedentes de esplenocitos de ratones no inmunizados, no son capaces de causar la lisis de la línea tumoral IGR-Heu ni de la línea tumoral TT, a diferencia de los linfocitos T CD8 procedentes de esplenocitos de ratones inmunizados. Dependiendo de las condiciones de inmunización, los linfocitos causan la lisis de entre el 7 y el 15 % de las células que expresan el antígeno ppCT. Los linfocitos T no causan la lisis de las células K562 o de las células Heu-EBV a menos que estén cargadas con la combinación peptídica. Este resultado muestra la especificidad de la lisis obtenida para las células tumorales que expresan el antígeno ppCT.

45 Todos los resultados, obtenidos mediante la inmunización de ratones transgénicos, demuestran que el uso de combinaciones peptídicas permite activar y aumentar la respuesta inmunitaria ejercida por los linfocitos T CD8 contra las células que expresan el antígeno ppCT.

EJEMPLO 4: VACUNACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS CON LA COMBINACIÓN C6

50 MATERIAL Y MÉTODOS

Péptidos

Se seleccionaron los siguientes péptidos:

55 ppCT1-15: MGFQKFSPFLALSIL (SEQ ID NO: 1);
ppCT86-100: GNLSTCMLGTYTQDF (SEQ ID NO: 3);
ppCT9-17 FLALSILVL (SEQ ID NO:4);
ppCT16-25 VLLQAGSLHA (SEQ ID NO:5);
60 ppCT50-59 LLAALVQDYV (SEQ ID NO:6).

Células utilizadas

65 La línea murina LL2 (carcinoma de pulmón de Lewis) transgénica para las moléculas HLA-A2 (línea D122) se infectó con un lentivirus que expresa GFP (por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente) y que codifica el antígeno humano ppCT. A continuación, por vía subcutánea, se inyectaron 10⁶ células en el costado

de los ratones.

Inmunización de ratones

- 5 Los ratones transgénicos para las moléculas HLA-A2 se vacunaron 4 veces (D0, D4, D7 y D14) por vía subcutánea en el costado con 100 µl de la combinación peptídica C6 que contenía una mezcla equimolar de 100 µM de cada uno de los péptidos y de un adyuvante (25 µg de Poli (I: C)).

Control del crecimiento tumoral

- 10 Después de inyectar las células tumorales, se realizó un control diario del peso de los ratones y los tumores se midieron cada 2-3 días a partir del 7º día. El tamaño se calculó en mm³ de la siguiente manera: Longitud x anchura x profundidad. La diferencia de crecimiento tumoral estadísticamente significativa se calculó mediante una prueba de la t y se indicó (*p<0,05).

RESULTADOS

- 20 En el modelo de ratón transgénico para las moléculas HLA-A2 con un tumor que expresa ppCT, la vacunación con la combinación C6 induce una reducción de manera significativa del crecimiento tumoral en comparación con los ratones no vacunados. En efecto, al cabo de 21 días, solo uno de cada 3 ratones vacunados presenta un tumor con un tamaño de 190 mm³, mientras que los 3 ratones de control desarrollaron un tumor con un tamaño promedio de 350 mm³ (Figura 6).

- 25 Este resultado muestra la capacidad de la vacunación con la combinación C6 para generar una respuesta inmunitaria eficaz contra tumores que expresan ppCT, demostrando así el interés que suscita el uso de estas combinaciones en la inmunoterapia antitumoral.

EJEMPLO 5: VACUNACIÓN DE RATONES HUMANIZADOS CON LA COMBINACIÓN C6 SOLA O COMBINADA CON UN ANTI-PD-1

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratón, injerto de tumor humano y transferencia de CMSP humanas

- 35 Ratones *NOD-scid Il2r^{nu}* (NSG; Jackson Laboratory) de 3 a 4 semanas de vida, se inyectaron por vía subcutánea con el tumor humano Heu-nIR, generado por implante de la línea de células tumorales humanas IGR-Heu previamente transfectada con la quimiocina CCL5 (Rantes) y la molécula de adhesión ICAM-1 para optimizar la infiltración del tumor por los linfocitos T y su capacidad de interactuar con las células diana, y mantenida en ratones desnudos (Franciszkievicz et al., Cancer Res., 2009, 69, 6249-6255). Diez (10) días después, cuando los tumores eran palpables, 2.10⁷ células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes humanos alogénicos sanos, previamente analizadas *in vitro* por su capacidad para inducir respuestas en células T CD8 dirigidas contra los péptidos antigénicos ppCT, se inyectaron en los ratones por vía intravenosa en la cola. A continuación, para favorecer la supervivencia de las células T, se administró IL-15 recombinante (3 µg/ratón/día) por vía intraperitoneal.

Péptidos

Los péptidos utilizados son:

- 50 - la combinación C6 constituida por los péptidos ppCT9-17, ppCT16-25 y ppCT50-59 que comprenden epítomos restringidos a HLA-A y péptidos largos ppCT1-15 y ppCT86-100, y
 - la combinación C6a que comprende además péptidos de la combinación C6, tres péptidos restringidos a HLA-B7: ppCT7-15 (SEQ ID NO: 19), ppCT46-54 (SEQ ID NO: 20) y ppCT79-88 (SEQ ID NO: 21).

Inmunización de ratones y control del crecimiento tumoral

- 55 Ratones NSG, que habían recibido un injerto de tumor Heu-nIR y una transferencia adoptiva de CMSP, se vacunaron 2 veces con una semana de diferencia, con 100 µl de la combinación peptídica C6 o C6a que contenía una mezcla equimolar de cada uno de los péptidos y de adyuvante (25 µg de poli (I:C)), un día después de la transferencia de CMSP. Para la terapia combinada, los ratones vacunados se trataron por vía intravenosa con un anticuerpo anti-hPD-1 (220 mg/inyección) o con un anticuerpo de control del mismo isotipo (220 mg de hlgG4 irrelevante), cada dos días a partir del segundo día después de la transferencia de CMSP.

- 65 El peso de los ratones se controló diariamente y los tumores se midieron cada 2 días solamente durante 3 o 4 semanas para evitar la reacción de injerto contra hospedador (EICH). Las muestras de plasma se tomaron el último día del experimento, antes del sacrificio de los ratones y se conservaron a -80° C hasta que se utilizaron. Los ratones se sacrificaron y los tumores se pesaron y se disociaron mediante citometría de flujo para el análisis de los linfocitos

infiltrantes de tumor (TIL, por las iniciales de su denominación en inglés *Tumor-infiltrating lymphocytes*). En paralelo, se extirpó el bazo y después se analizó la capacidad de los esplenocitos para secretar interferón gamma (IFN- γ) después de la estimulación *ex vivo* con la combinación de péptidos.

5 **Ensayos ELISA**

Los niveles de IFN- γ humano en el plasma de ratones vacunados y no vacunados se midieron usando un kit ELISA comercial (Human IFN- γ ELISA Set; BD OptEIA™, BD Biosciences), según las recomendaciones del fabricante. Todas las muestras se midieron por duplicado.

10

Anticuerpos y análisis de inmunofluorescencia

Los anticuerpos utilizados son los anticuerpos monoclonales anti-CD45, CD3, CD8, CD4, CD44, PD-1, Perforina, Granzima B e IFN- γ humanos, así como los controles isotípicos de ratones y conejos (Miltenyi) y los anticuerpos monoclonales anti-CD69, CD62L, CD49a, CD45RO y CCR7 humanos (Invitrogen). Los experimentos de bloqueo se realizaron con el anticuerpo monoclonal humano anti-PD-1 y el anticuerpo de control irrelevante del mismo isotipo. Los análisis fenotípicos se realizaron por inmunofluorescencia directa, utilizando un citómetro de flujo BD™ LSR II. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo®.

15

20 **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático Prism 6.0 (programa informático GraphPad). Los resultados de los diferentes grupos se compararon utilizando la prueba de la T para muestras independientes. Un valor de $P < 0,05$ para una prueba bilateral se considera estadísticamente significativo.

25

RESULTADOS

El efecto antitumoral de la vacuna peptídica basada en péptidos antigénicos de la preprocalcitonina se evaluó en un modelo de ratón NOD-scid *IL2R γ ^{null}* (NSG) humanizado. Para invertir el agotamiento de los linfocitos T activados y potenciar aún más el efecto terapéutico beneficioso de la vacuna contra el cáncer, esta estrategia de inmunoterapia activa se combinó con un anticuerpo monoclonal anti-PD1 utilizado en la clínica. Los ratones NSG recibieron un injerto de tumor Heu-nIR y después una transferencia adoptiva de CMSP de donantes sanos HLA-A2+ y a continuación se inmunizaron con la vacuna basada en la combinación C6 o C6a, sola o en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario PD-1.

35

Los resultados muestran que el tratamiento de ratones humanizados con inmunoterapia combinada induce una reducción mucho más fuerte en el crecimiento tumoral que cada una de la monoterapia (Figura 7A). El control del crecimiento tumoral se correlaciona con una reducción en el peso de los tumores en los ratones tratados con la terapia combinada, en comparación con los ratones tratados con la vacuna o con anti-PD1 solo (Figura 7B).

40

a continuación se evaluó la producción de IFN- γ humano con los tres grupos de ratones para analizar si la reducción en el crecimiento tumoral estaba asociada a un aumento en la respuesta inmunitaria. En el suero de los ratones tratados con inmunoterapia combinada, se detectó un aumento de 2 veces en los niveles plasmáticos de IFN- γ humano, en comparación con los ratones tratados con cada una de las terapias solas (Figura 7C). Asimismo, la tinción intracelular de los esplenocitos de los ratones tratados con la terapia combinada, indica que las células T CD8+ expresan niveles más altos de IFN- γ , granzima B y perforina (Figura 7D). Estos resultados indican que, en comparación con las dos monoterapias, la terapia combinada es más eficaz para controlar el crecimiento de los tumores y este efecto se correlaciona con funciones más eficaces de células T.

45

50 El efecto antitumoral de la terapia combinada se observa con las dos combinaciones peptídicas analizadas; la combinación C6 que comprende péptidos restringidos a HLA-A2 y péptidos largos (Figuras 7A y 7B) y la combinación C6a que además de los péptidos de la combinación C6 también incluye péptidos restringidos a HLA-B7 (Figura 8A y 8B).

55 El enfoque combinado induce un aumento de la secreción de IFN- γ por las células T CD8 y de la infiltración del tumor por células T activadas, correlacionados con una reducción del crecimiento tumoral. Por consiguiente, la terapia combinada representa una estrategia interesante para los tratar los tumores que han escapado de la inmunidad de las células T CD8 o para la inmunoterapia convencional.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición **caracterizada por que** comprende una combinación de secuencias peptídicas seleccionadas entre la combinación de secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5 y 6, la combinación de secuencias SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 y 6 y la combinación de las secuencias SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 6, presentándose cada una de dichas secuencias en forma de un péptido de 9 a 15 aminoácidos o incluyéndose en un polipéptido quimérico multiepitópico.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** comprende una mezcla de péptidos de 9 a 15 aminoácidos.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada por que** comprende un polipéptido quimérico que comprende dicha combinación de secuencias peptídicas, estando dichas secuencias adyacentes, unidas por un elemento enlazador constituido por 1 a 5 aminoácidos, o separadas por una secuencia que comprende un epítipo de una proteína distinta de la preprocalcitonina.
- 20 4. Composición que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una mezcla de péptidos como se define en la reivindicación 2 o que codifica un polipéptido quimérico como se define en la reivindicación 3.
- 25 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende células presentadoras de antígeno cargadas con dichas secuencias peptídicas.
- 30 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además, al menos un inhibidor del punto de control inmunitario, y/o una de las secuencias peptídicas de SEQ ID NO: 19, 20 y/o 21.
- 35 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como un medicamento.
- 40 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en inmunoterapia antitumoral.
9. Composición para su uso según la reivindicación 8, **caracterizada por que** dicha composición está destinada a la inmunoterapia de tumores que expresan calcitonina, o de patologías asociadas a un alto nivel en suero de calcitonina, precalcitonina o prepro- α -CGRP.
10. Composición para su uso según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, **caracterizada por que** dicha composición está destinada a la inmunoterapia de un carcinoma medular tiroideo o de un carcinoma pulmonar.
11. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizada por que** dicha composición está destinada a la inmunoterapia de un tumor cuyas células no expresan los transportadores de péptidos TAP.
12. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, **caracterizada por que** dicha composición está destinada al tratamiento de un paciente HLA-A*0201.

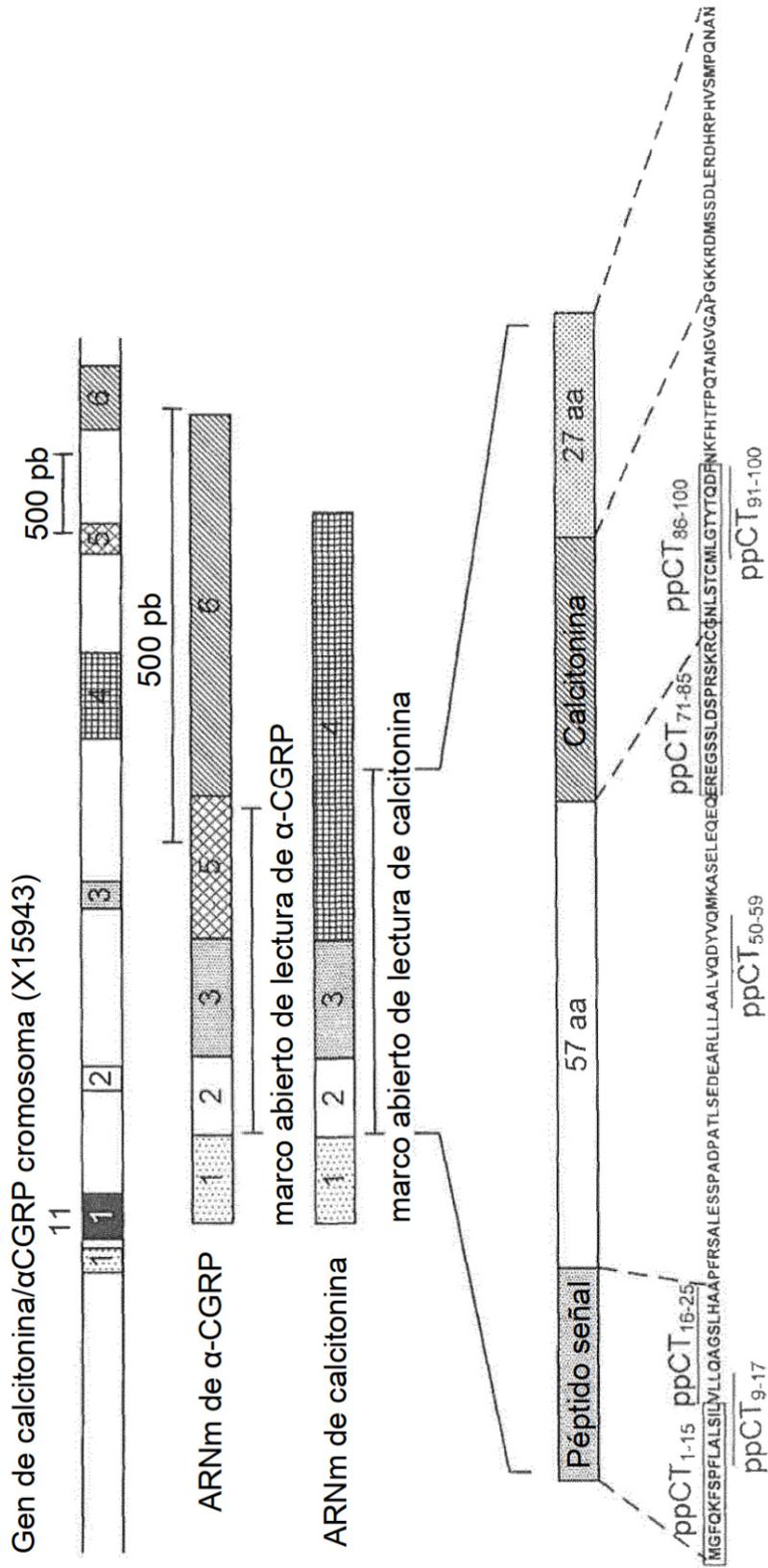


Fig. 1

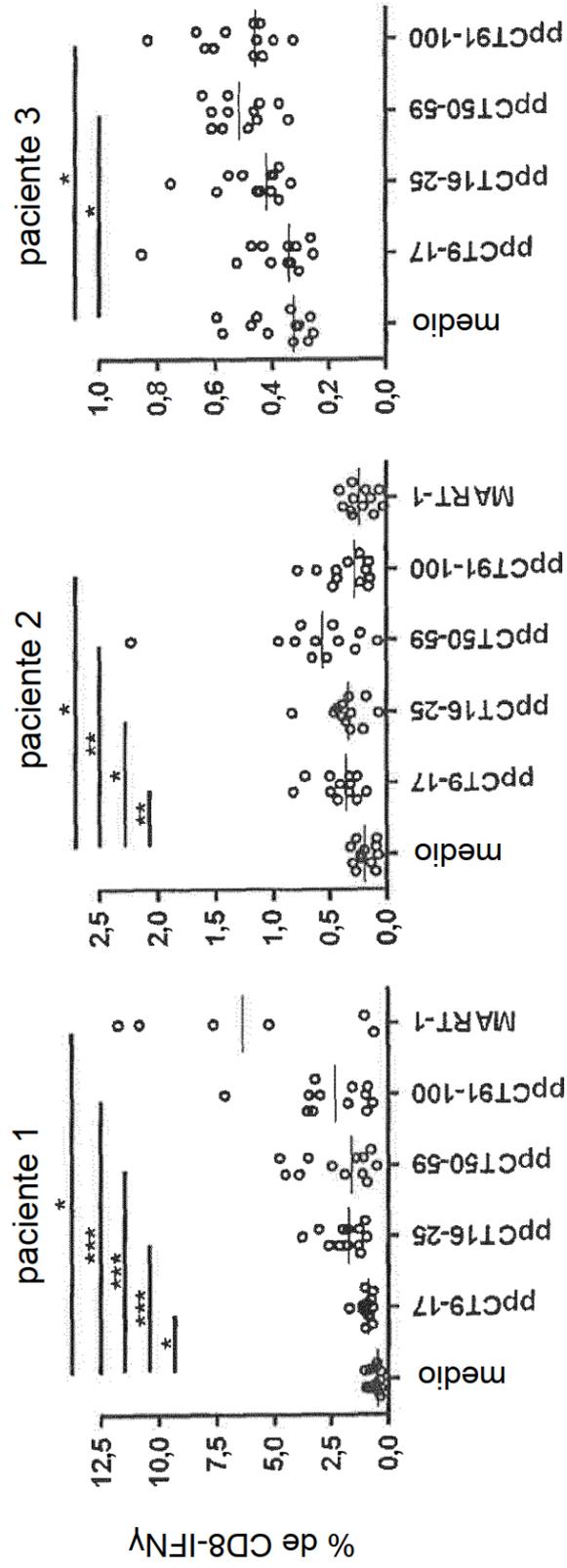


Fig. 2A

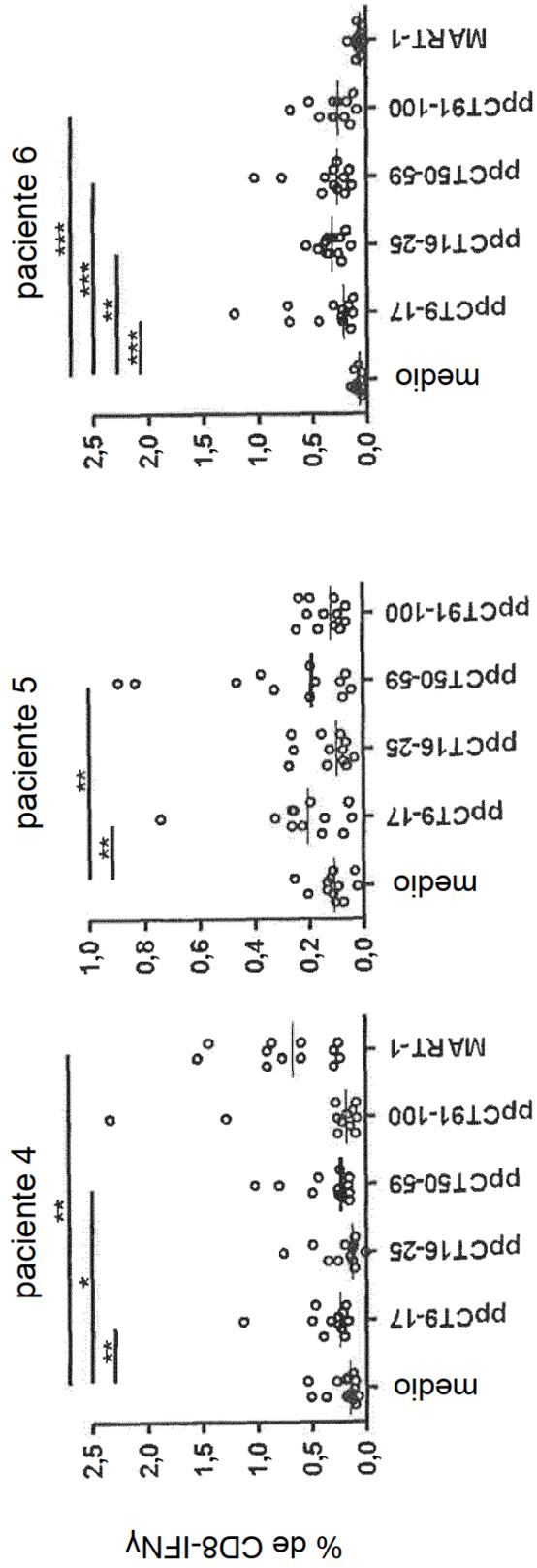


Fig. 2B

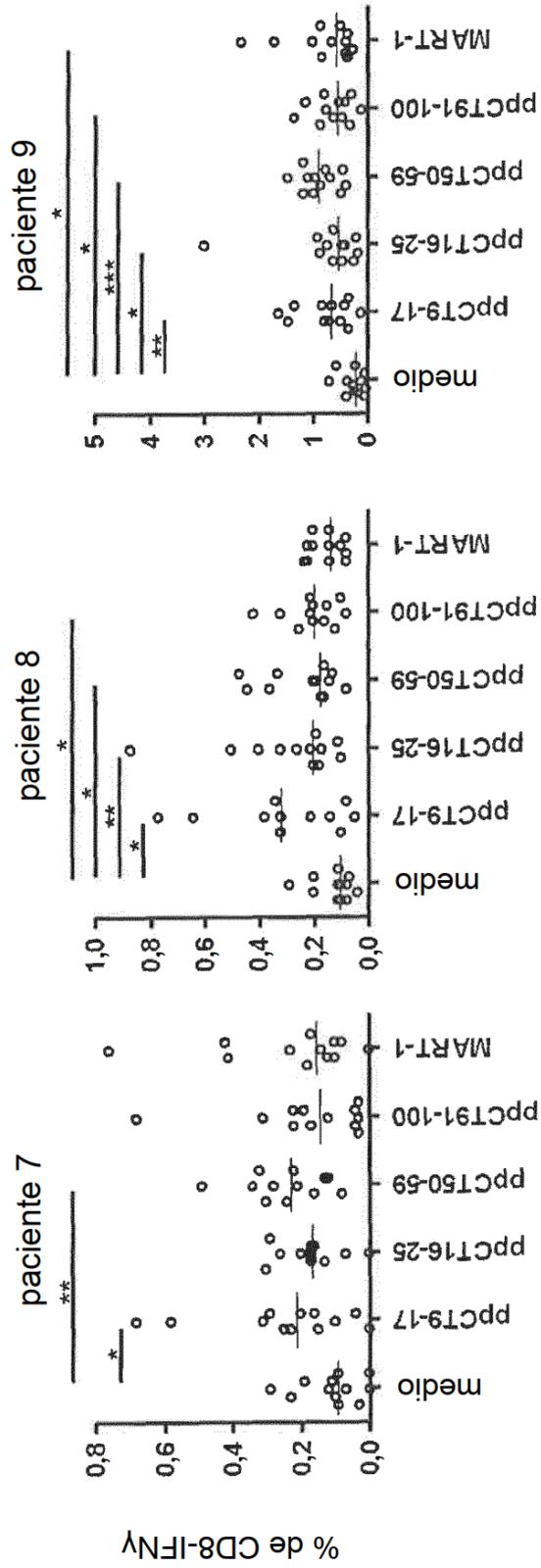


Fig. 2C

Combinación 1: 3 péptidos de 15 aa: ppCT₁₋₁₅ ppCT₇₁₋₈₅ ppCT₈₆₋₁₀₀
 ppCT₁₋₁₅ ppCT₇₁₋₈₅ ppCT₈₆₋₁₀₀
 [MGFQKFSFLALSI][VLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRSKR][CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPPQAN]

Combinación 2: 4 péptidos, 2 de 15 aa y 2 de 10 aa: ppCT₁₋₁₅ ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₅₀₋₅₉
 ppCT₁₋₁₅ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₅₀₋₅₉
 [MGFQKFSFLALSI][VLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRSKR][CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPPQAN]

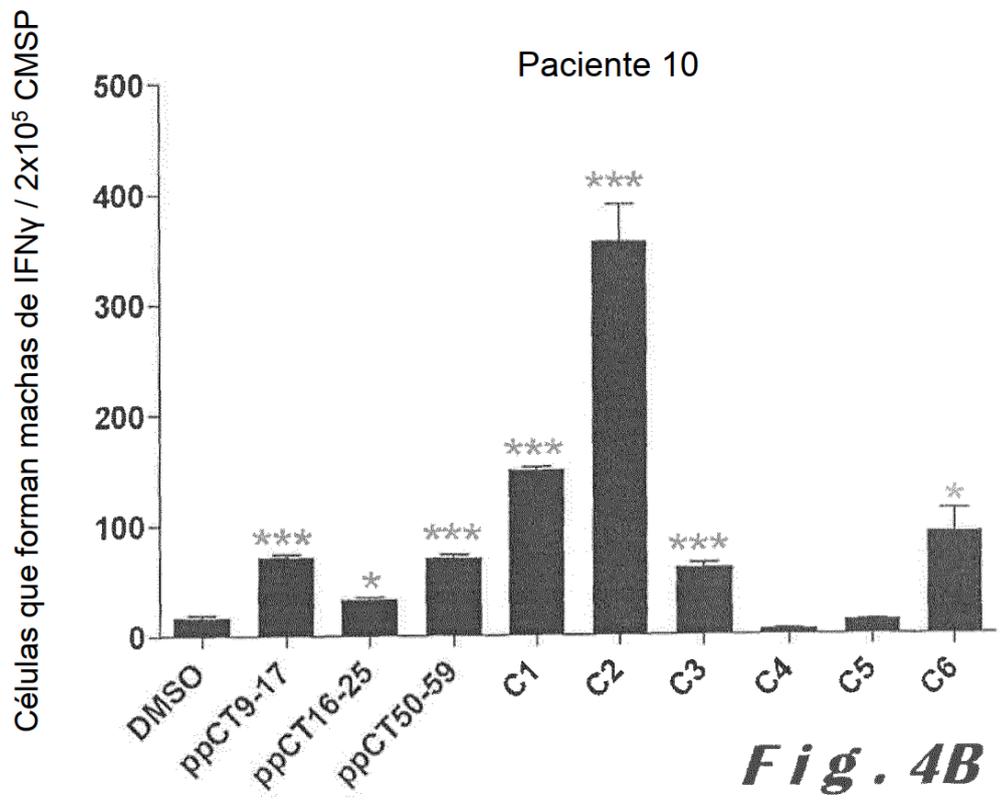
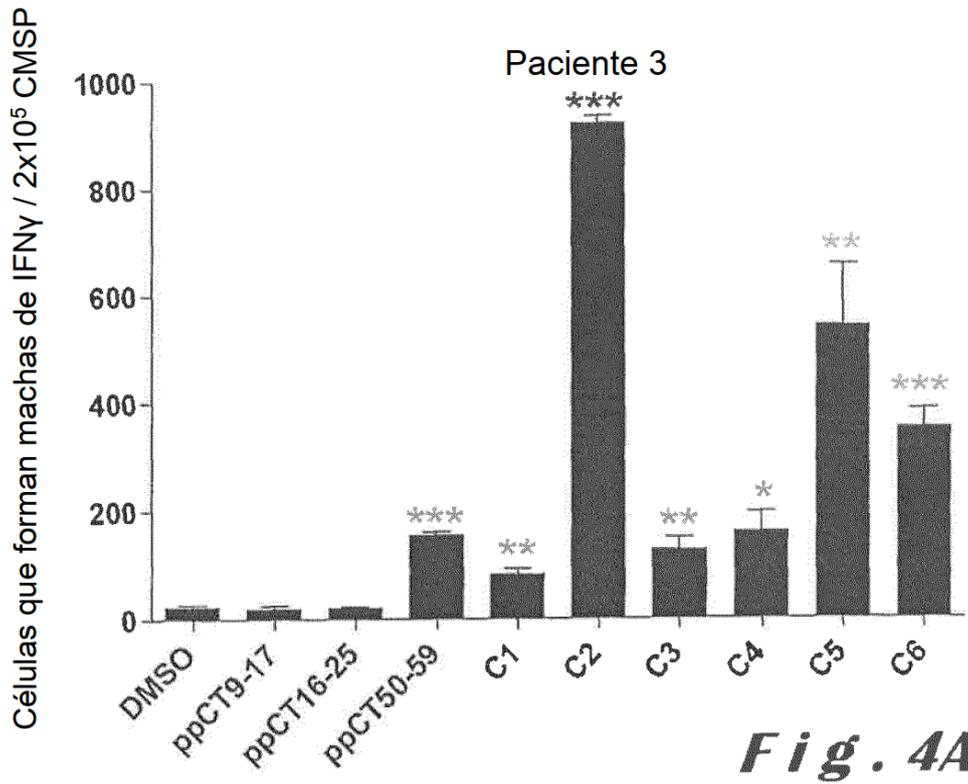
Combinación 3: 4 péptidos, 2 de 15 aa y 2 de 10 aa: ppCT₁₋₁₅ ppCT₇₁₋₈₅ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₅₀₋₅₉
 ppCT₁₋₁₅ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₇₁₋₈₅ ppCT₅₀₋₅₉
 [MGFQKFSFLALSI][VLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRSKR][CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPPQAN]

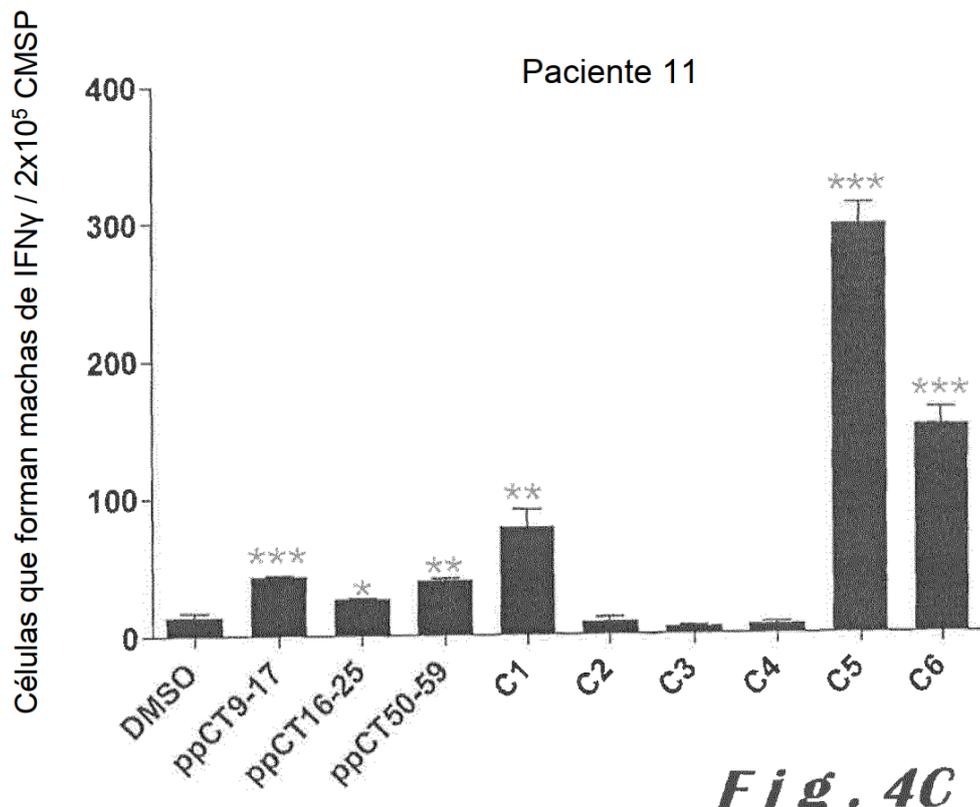
Combinación 4: 4 péptidos, 1 de 15 aa y 2 de 10 aa y 1 de 9 aa: ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₉₋₁₇ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₅₀₋₅₉
 ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₉₋₁₇ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₅₀₋₅₉
 [MGFQKFSFLALSI][VLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRSKR][CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPPQAN]

Combinación 5: 5 péptidos, 3 de 15 aa y 2 de 10 aa: ppCT₁₋₁₅ ppCT₇₁₋₈₅ ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₅₀₋₅₉
 ppCT₁₋₁₅ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₇₁₋₈₅ ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₅₀₋₅₉
 [MGFQKFSFLALSI][VLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRSKR][CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPPQAN]

Combinación 6: 5 péptidos, 2 de 15 aa y 2 de 10 aa y 1 de 9 aa: ppCT₁₋₁₅ ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₉₋₁₇ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₅₀₋₅₉
 ppCT₁₋₁₅ ppCT₁₆₋₂₅ ppCT₈₆₋₁₀₀ ppCT₉₋₁₇ ppCT₅₀₋₅₉
 [MGFQKFSFLALSI][VLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEARLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRSKR][CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMPPQAN]

Fig. 3





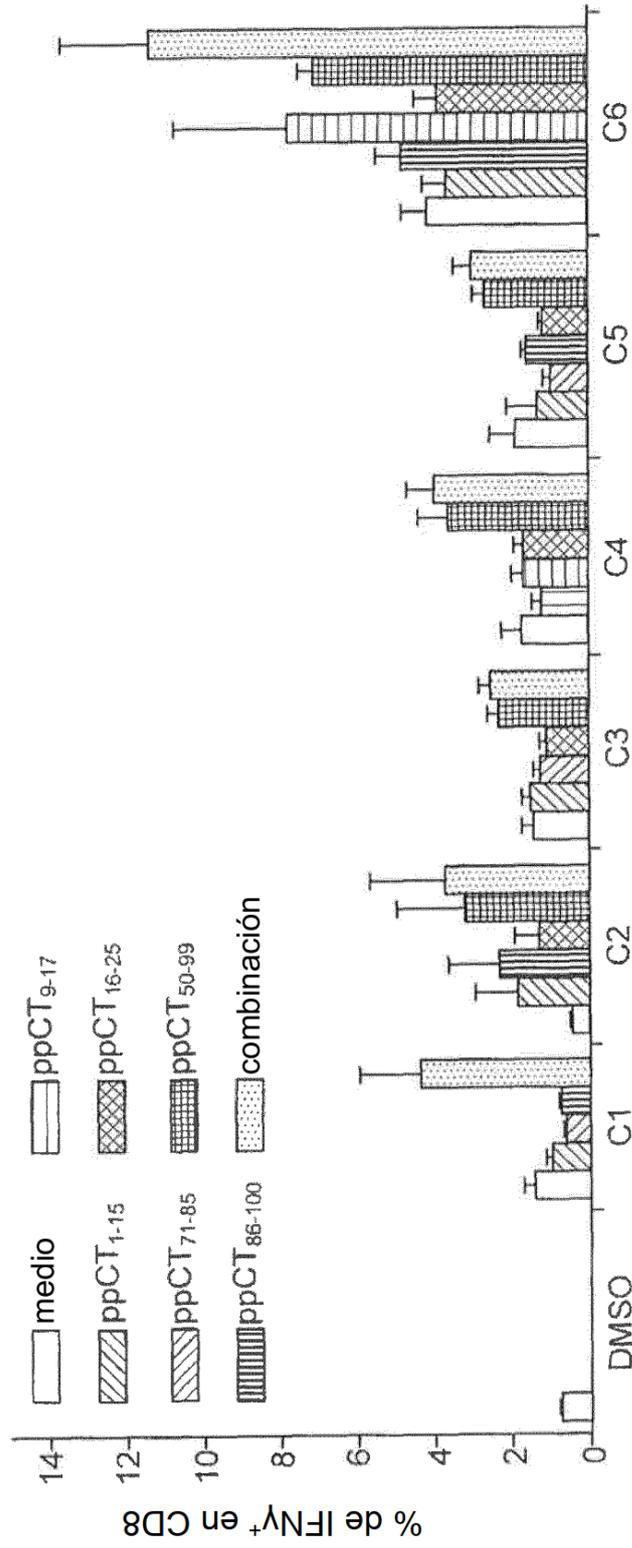


Fig. 5A

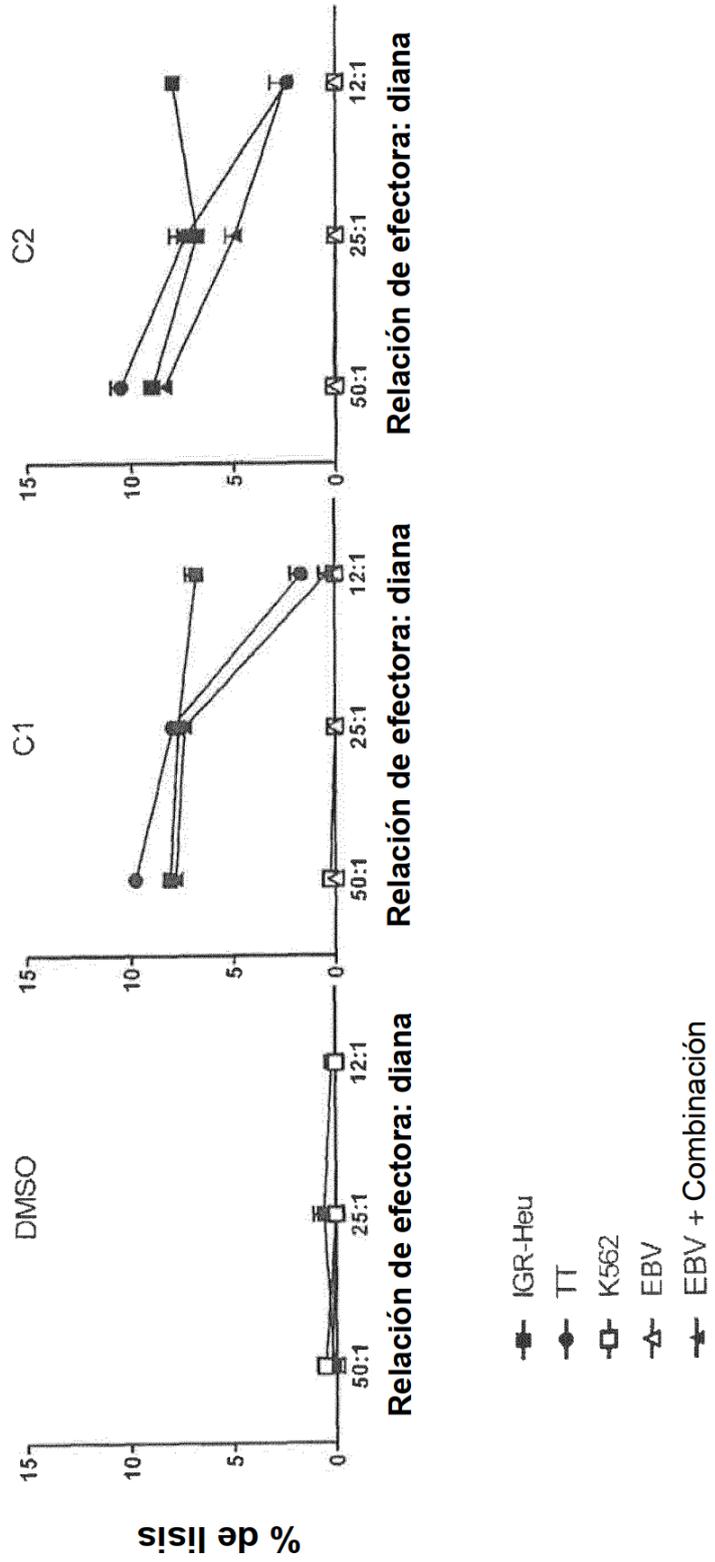


Fig. 5B'

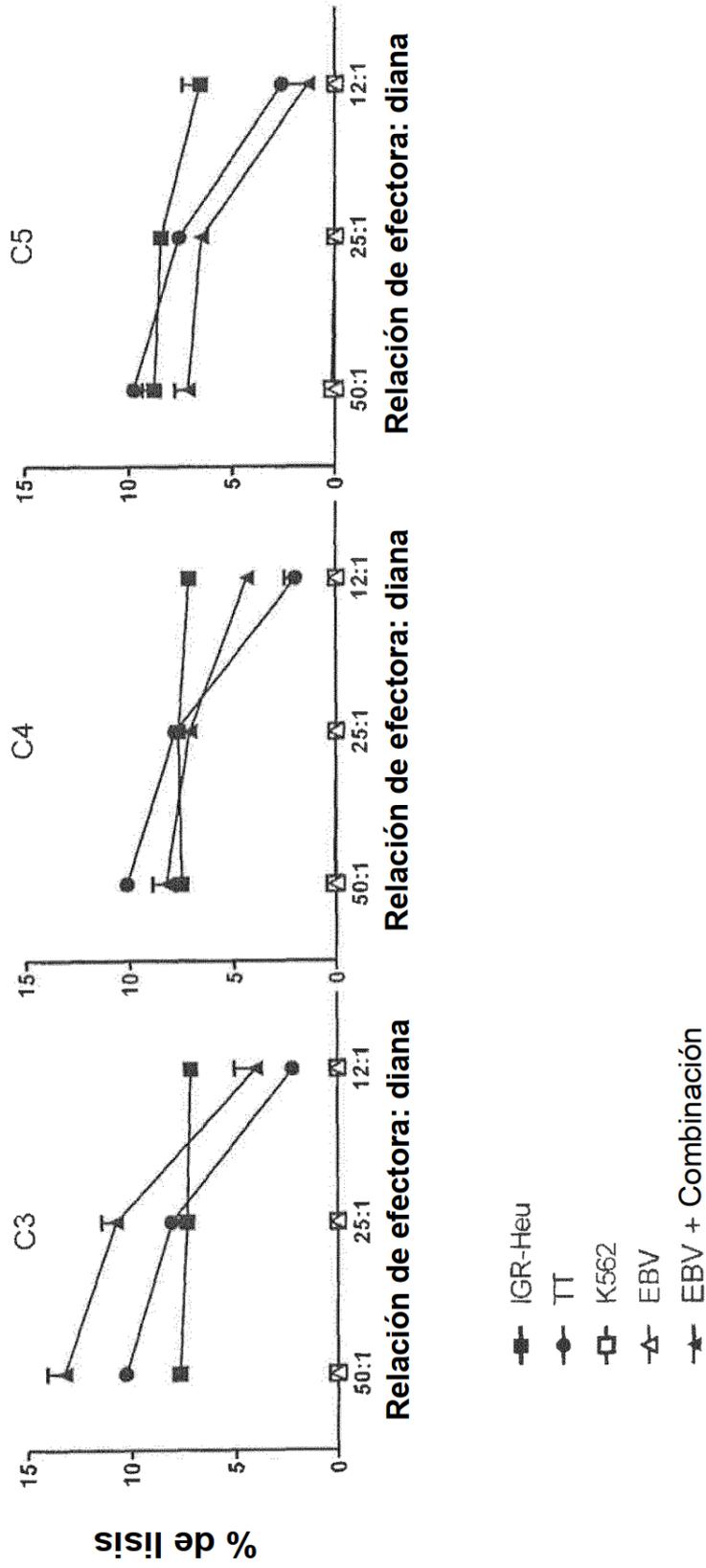


Fig. 5B

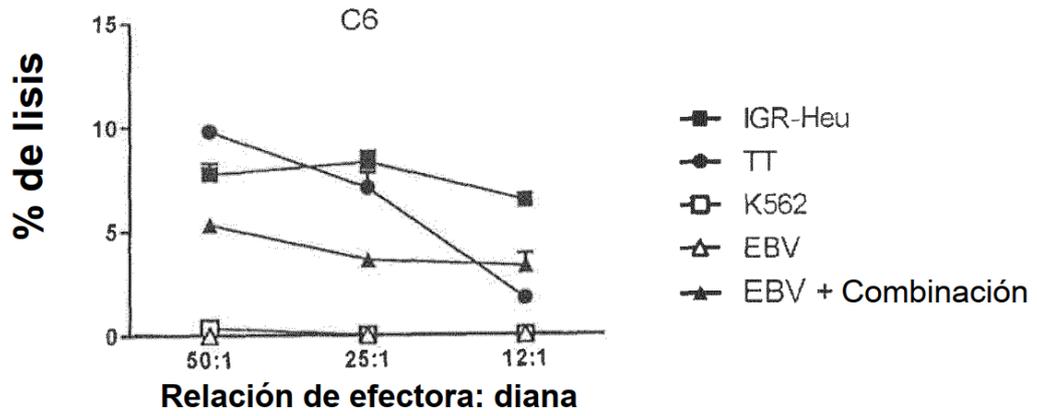


Fig. 5B''

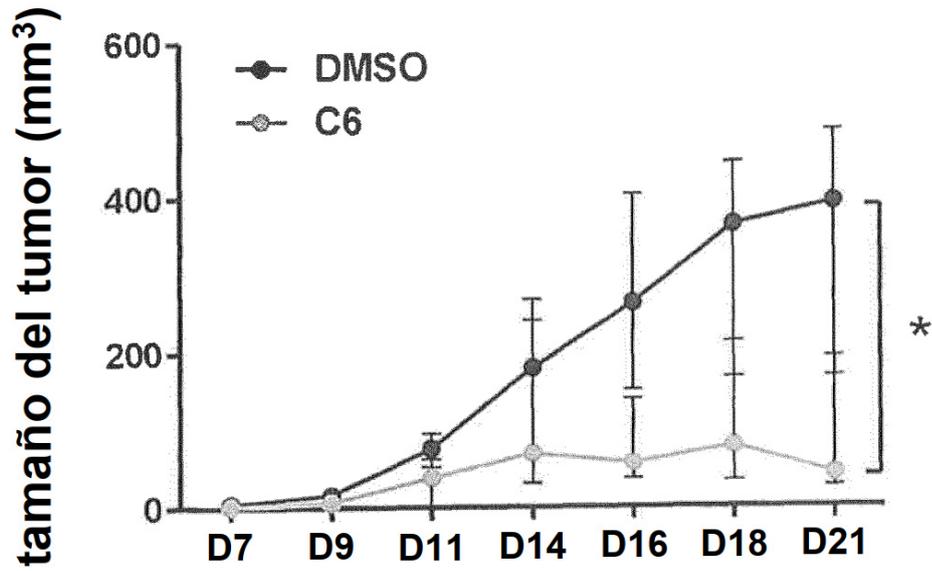


Fig. 6

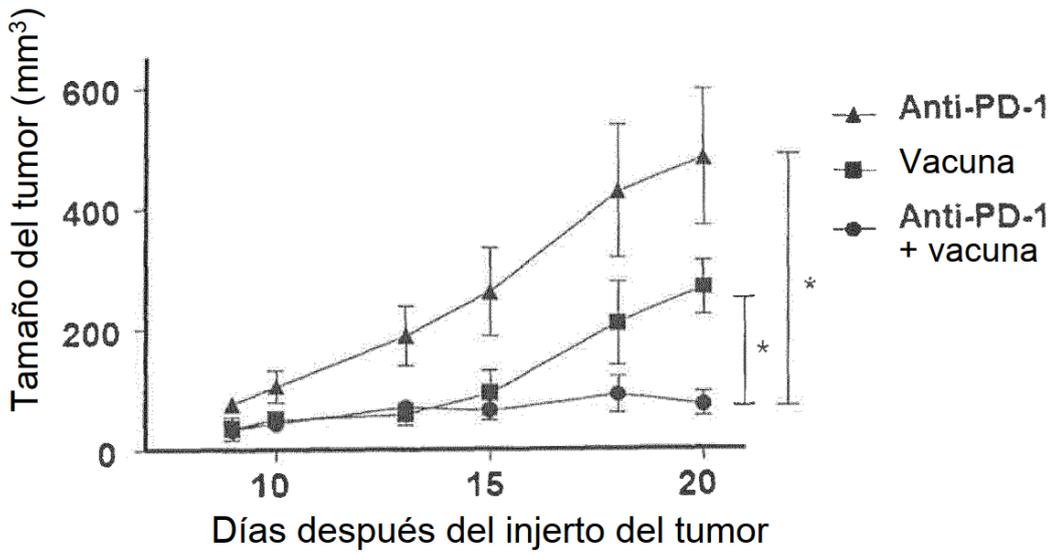


Fig. 7A

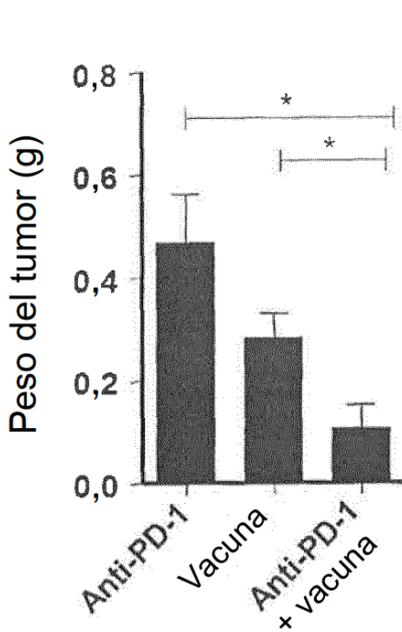


Fig. 7B

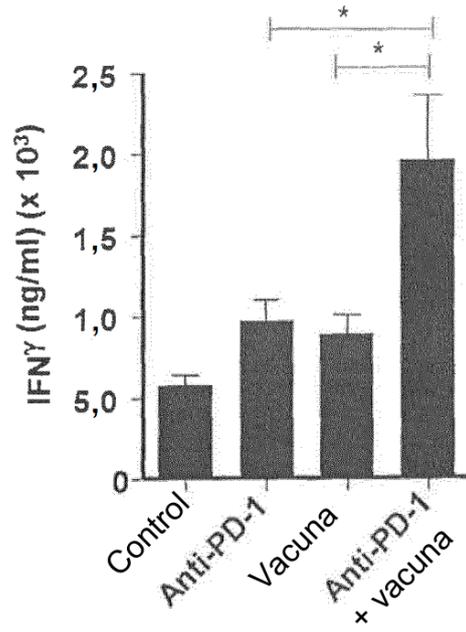


Fig. 7C

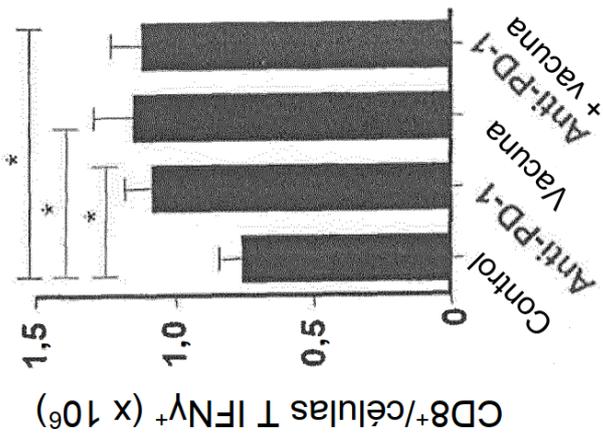
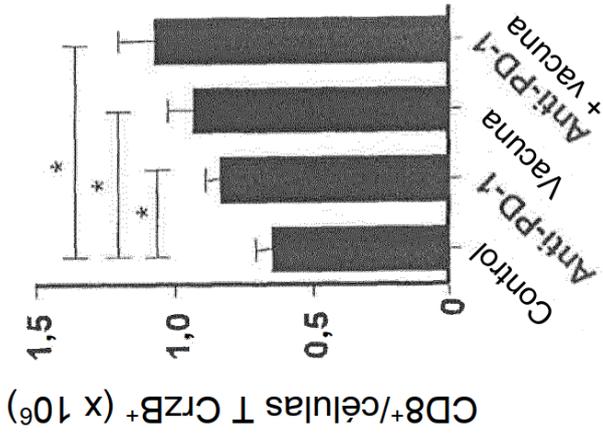
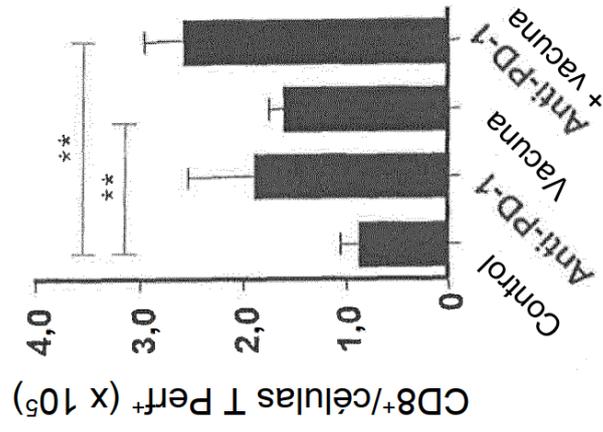


Fig. 7D

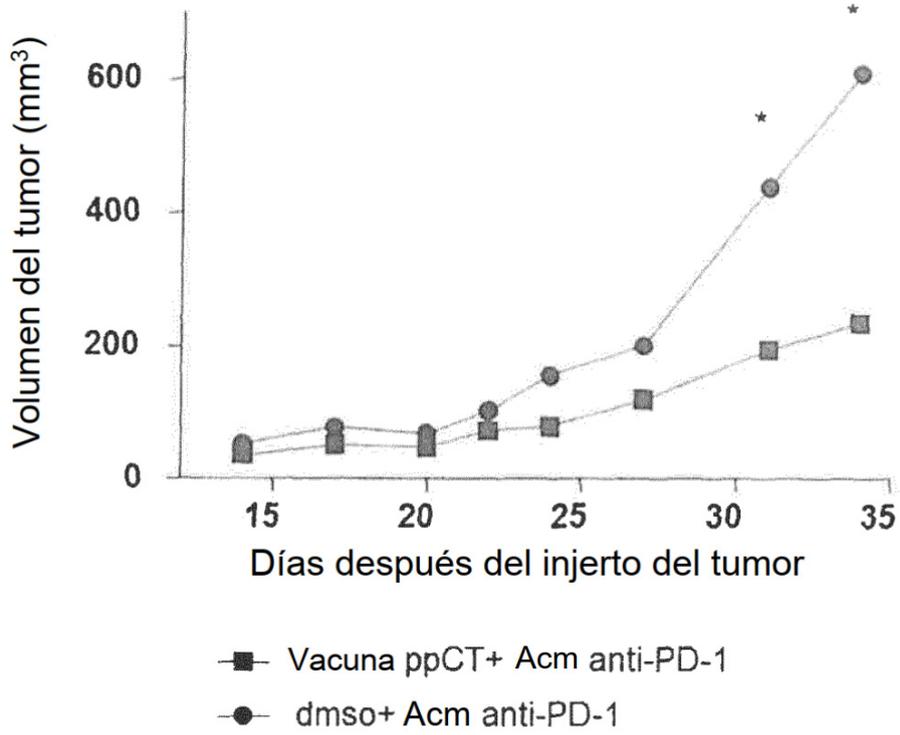


Fig. 8A

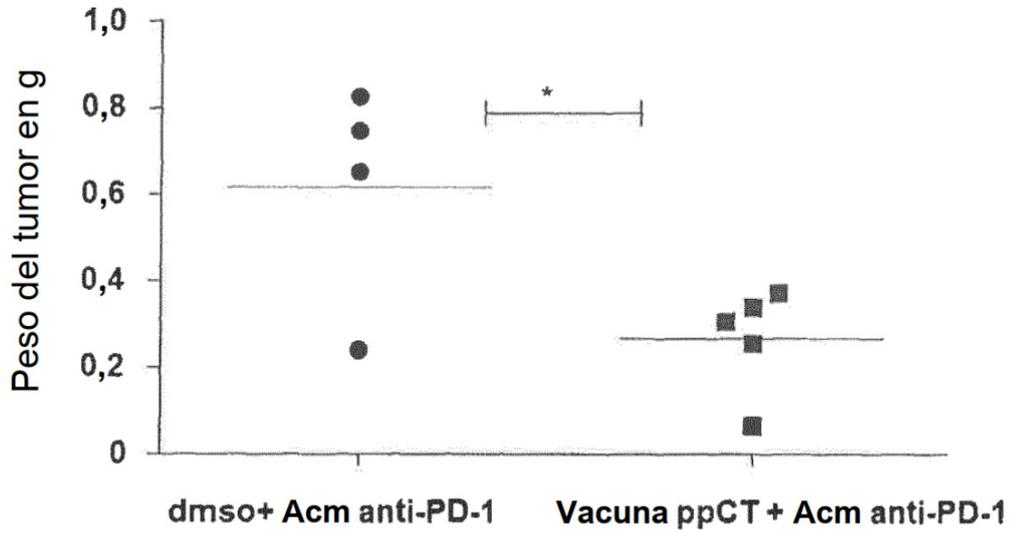


Fig. 8B