

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 301**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/82</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/0783</b>	(2010.01)
<b>C07K 14/74</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2014 PCT/JP2014/077807**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15060235**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2014 E 14856540 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3061771**

54 Título: **Nuevo péptido con cuatro epítomos CTL unidos**

30 Prioridad:

**21.10.2013 JP 2013218524**  
**30.07.2014 JP 2014155132**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2020**

73 Titular/es:

**TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)**  
**1-27, Kandanishiki-cho**  
**Chiyoda-ku, Tokyo 101-8444, JP**

72 Inventor/es:

**FUKAYA SATOSHI;**  
**OSADA TOSHIHIRO y**  
**WADA HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 796 301 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

Nuevo péptido con cuatro epítomos CTL unidos

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un nuevo péptido que es útil como péptido antigénico para el cáncer. De manera más particular, la presente invención se refiere a un nuevo péptido antigénico para el cáncer que tiene 4 péptidos unidos capaces de inducir respuestas CTL restringidas por HLA-A y a una composición farmacéutica que utiliza el mismo.

**Técnica antecedente**

10 El cáncer es la principal causa de muerte en Japón. Aproximadamente 350.000 pacientes mueren de cáncer cada año, y el cáncer sigue siendo una enfermedad grave hoy en día. Los enfoques de tratamiento para el cáncer que se han establecido son la resección quirúrgica, el tratamiento farmacológico contra el cáncer y la radioterapia. Sin embargo, tales estrategias de tratamiento son problemáticas en términos de, por ejemplo, recidiva, disminución de la calidad de vida (CV) y falta de opciones de tratamiento en el caso de cánceres en estadio avanzado que no pueden tratarse con las estrategias descritas anteriormente.

15 Durante un largo período de tiempo la inmunoterapia del cáncer (vacunas para el cáncer) se previó como una técnica terapéutica nueva, y los estudios clínicos sobre vacunas peptídicas para el cáncer se iniciaron en todo el mundo en 1990, cuando se identificaron péptidos de epítomos en antígenos tumorales humanos. Sin embargo, de acuerdo con los resultados del análisis de estudios clínicos realizados mediante la administración de un péptido solo o en combinación con otros agentes, la tasa de respuesta es tan baja como del 2,7 % entre 1.000 o más casos (Rosenberg SA y col., Nature Med., 2004, 10 (9): 909-15). Por lo tanto, se ha señalado la dificultad en la aplicación práctica.

20 Por otra parte, los estudios clínicos que implican el uso de vacunas peptídicas particulares para el cáncer han estado en marcha durante un largo período de tiempo en Japón, y los logros de tales estudios se han articulado de manera gradual. En los últimos años, se ha intentado una estrategia de administración de múltiples péptidos de cáncer en lugar de un solo tipo de péptido de cáncer, con el objetivo de mejorar el resultado del tratamiento. Por ejemplo, el tipo de HLA y las respuestas inmunitarias específicas de un paciente se examinan de antemano, para implementar un tratamiento del cáncer a medida utilizando vacunas peptídicas que comprende seleccionar múltiples péptidos adecuados a administrar y de las que se ha verificado los efectos antitumorales y de seguridad. Mediante la administración de vacunas peptídicas a medida solas o en combinación con fármacos contra el cáncer, más específicamente, se han logrado excelentes efectos clínicos y seguridad en los casos de tumor cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata y cáncer de páncreas (Terasaki, M. y col., J. Clin. Oncol., 2011, 29 (3): 337-44; Noguchi, M. y col., Cancer Immunol. Immunother., 2010, 59 (7): 1001-9; Yanagimoto, H. y col., Cancer Sci., 2007, 98 (4): 605-11).

35 La inmunidad celular que consiste en linfocitos T citotóxicos específicos de epítomo (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como "CTL"), que se consideran las principales células efectoras en el tratamiento del cáncer con vacunas peptídicas, es restrictivo por HLA. Por consiguiente, se ha intentado el desarrollo de vacunas peptídicas para el cáncer dirigidas exclusivamente a pacientes con un tipo particular de HLA, en concreto el tipo HLA-A2 o HLA-A24, debido al gran número de pacientes con los mismos.

40 Sin embargo, los japoneses con tales dos tipos de HLA representan aproximadamente el 40 % y el 60 %, respectivamente (Sette, A. y col., Immunogenetics, 1999, 50 (3-4): 201-12). De forma desventajosa, los pacientes con otros tipos de HLA no pueden obtener beneficios de las vacunas peptídicas para el cáncer. Además, el momento de inicio del tratamiento se pospondría debido al tipado de HLA realizado antes del inicio del tratamiento, y aumentaría la carga sobre los pacientes. Por consiguiente, es conveniente la investigación y el desarrollo de vacunas peptídicas para el cáncer que sean aplicables a todos los pacientes con cáncer sin tipado de HLA.

45 Con respecto al tratamiento del cáncer con vacunas peptídicas, además de las activaciones de los CTL como una de las inmunidades celulares, las inducciones de la producción de inmunoglobulinas, conocidas como inmunidad humoral, se sabe que son atribuibles al beneficio de supervivencia (Noguchi, M. y col., Cancer Biol. Ther., 2011, 10 (12):1266-79).

50 El documento EP 2966092 A1 desvela un péptido de antígeno de cáncer que tiene 5 epítomos CTL unidos para el tratamiento del cáncer. El documento US 2007/055049 A1 se refiere a péptidos inmunogénicos que se unen específicamente a glucoproteínas codificadas por alelos del HLA y que inducen la activación de linfocitos T útiles para suscitar una respuesta inmunitaria contra un antígeno deseado. Los documentos EP 2192407 A2 y EP 1767541 A1, Liao y col. (2013), Internat Immunopharmacol 16:444 y van der Burg y col. (2006), Adv Drug Deliv Rev 58:916 desvelan péptidos para vacunas para el cáncer.

55

**Sumario de la invención****Objetos a lograr mediante la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un péptido antigénico de cáncer que pueda administrarse como una vacuna peptídica para el cáncer a una amplia diversidad de pacientes con cáncer y que pueda inducir inmunoglobulinas de forma sólida, independientemente de los tipos de HLA de los pacientes.

**Medios para lograr los objetos**

Los presentes inventores obtuvieron un péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos mediante la unión, a través de engarces, de 4 péptidos seleccionados entre los péptidos de epítomo CTL informados como capaces de inducir una respuesta de CTL restringida a supertipo HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26 o HLA-A3 o una pluralidad de respuestas de CTL restringidas a HLA-A. Los presentes inventores han realizado estudios centrados en tal péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos para lograr los objetos anteriores. Como resultado, descubrieron que un péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos compuestos por 13 tipos particulares de péptidos seleccionados entre péptidos de epítomo de CTL procedentes de moléculas de antígenos tumorales conocidos podría administrarse a una amplia diversidad de pacientes con cáncer sin la necesidad de tipado de HLA e independientemente de los tipos de HLA de pacientes. Además, descubrieron que la administración de tal péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos podría inducir inmunoglobulinas de forma sólida, además de CTL específicos para los péptidos de epítomos CTL que componen tal péptido. Esto ha llevado a la finalización de la presente invención.

En concreto, la presente invención tiene las características especificadas en las reivindicaciones. Una divulgación adicional se refiere a:

[1] Un péptido que tiene 4 epítomos unidos, en el que los 4 péptidos de epítomo se seleccionan, opcionalmente de manera redundante, del grupo que consiste en péptidos de epítomo CTL: el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (PEP1); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (PEP2); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (PEP4); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 5 (PEP5); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 (PEP6); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 7 (PEP7); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 8 (PEP8); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 9 (PEP9); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 10 (PEP10); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 13 (PEP13); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 15 (PEP15); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 17 (PEP17); y el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 18 (PEP18), unidos a través de engarces, el péptido que tiene 4 epítomos unidos opcionalmente comprende otras secuencias peptídicas que consisten en aminoácidos hidrófilos, y el péptido que tiene 4 epítomos unidos tiene una o más características seleccionadas de las siguientes características (1) a (5):

- (1) el péptido comprende PEP2 en el extremo C (excepto el péptido que comprende PEP7 y PEP8 en el extremo N dispuestos sucesivamente en ese orden desde el extremo N a través de un engarce);
- (2) el péptido comprende PEP4 en el extremo C;
- (3) el péptido comprende PEP10 en el extremo C;
- (4) el péptido comprende PEP6 y PEP5 en el extremo C dispuestos sucesivamente en ese orden desde el extremo N a través de un engarce; y
- (5) el péptido comprende PEP5, PEP6, PEP9 y PEP18.

[2] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con [1], que comprende 4 péptidos no redundantes seleccionados entre PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18.

[3] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con [1] o [2] que tiene una cualquiera de las características seleccionadas de las siguientes características (1) a (5):

- (1) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL seleccionados entre PEP1, PEP7, PEP8 y PEP13, y PEP2 está dispuesto en el extremo C del péptido (excepto el péptido que comprende PEP7 y PEP8 en el extremo N dispuestos sucesivamente en tal orden desde el extremo N a través de un engarce);
- (2) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL, PEP5, PEP6 y PEP9, y PEP4 está dispuesto en el extremo C del péptido;
- (3) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL seleccionados entre PEP1, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18, y PEP10 está dispuesto en el extremo C del péptido;
- (4) el péptido comprende 2 péptidos de epítomo CTL, PEP1 y PEP7, y PEP6 y PEP5 están dispuestos sucesivamente en el extremo C en tal orden desde el extremo N a través de un engarce; y
- (5) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL, PEP5, PEP6 y PEP18, y PEP9 está dispuesto en el extremo C del péptido.

[4] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], que comprende una secuencia seleccionada de las siguientes secuencias, en las que "-(L)-" representa un engarce:

- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4;
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4;

- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4;
- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4;
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4;
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4;
- 5 - PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- 10 - PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2;
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;
- 15 - PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10
- PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10
- PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10
- 20 - PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10
- PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10;
- 25 - PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10;
- PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10
- PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10
- 30 - PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10
- PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10
- PEP6-(L)-PEP18-(L)-PEP5-(L)-PEP9;
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP18-(L)-PEP9;
- 35 - PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP6-(L)-PEP5; y
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP6-(L)-PEP5.

[5] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], en el que el engarce es un engarce aminoacídico.

40 [6] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [5], en el que el engarce aminoacídico es un dímero de arginina o un trímero de arginina compuesto por dos o tres restos de arginina unidos entre sí.

[7] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [6], en el que la otra secuencia peptídica que consiste en aminoácidos hidrófilos está unida al extremo N.

45 [8] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [7], en el que la otra secuencia peptídica que consiste en aminoácidos hidrófilos está compuesta por un trímero de arginina o un tetrámero de arginina compuesto por tres o cuatro restos de arginina unidos entre sí.

50 [9] El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [8], que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66.

55 [10] Un CTL obtenido estimulando linfocitos de sangre periférica utilizando el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [9].

[11] Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [9] o el CTL de acuerdo con [10].

[12] Una composición farmacéutica que comprende dos o más péptidos seleccionados entre los péptidos que tienen 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [9].

60 [13] La composición farmacéutica de acuerdo con [11] o [12], que es un agente inmunoterapéutico.

[14] Un procedimiento para el tratamiento del cáncer que comprende administrar el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de [1] a [9], el CTL de acuerdo con [10] o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [11] a [13] a un paciente con cáncer.

solicitud.

**Efectos de la invención**

La presente invención puede proporcionar un péptido antígeno de cáncer que puede administrarse a una amplia diversidad de pacientes con cáncer como una vacuna peptídica para el cáncer y que puede inducir inmunoglobulinas de forma sólida, independientemente de los tipos de HLA de los pacientes.

El péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos de acuerdo con la presente invención puede administrarse a una amplia diversidad de pacientes con cáncer sin la necesidad de tipado de HLA. Los ejemplos de tales pacientes incluyen los que son pacientes positivos para HLA-A2, pacientes positivos para HLA-A24, pacientes positivos para HLA-A26 y pacientes positivos para supertipo HLA-A3. El péptido como se describió anteriormente puede utilizarse para el tratamiento y/o la prevención del cáncer o de enfermedades provocada de este modo de tales pacientes. Además, la expresión de los antígenos tumorales que constituyen el péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos de acuerdo con la presente invención se observa en una pluralidad de tipos de cánceres. Por consiguiente, el péptido que tiene 4 epítomos CTL unidos de acuerdo con la presente invención puede utilizarse como una composición farmacéutica (y más específicamente, como un agente inmunoterapéutico) para el tratamiento y/o la prevención de una diversidad de cánceres. Mediante la administración del péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, además, se pueden inducir CTL específicos de péptidos de epítomo de CTL e inmunoglobulinas de manera más sólida, en comparación con la administración de una mezcla de una cantidad equivalente de péptidos de epítomo de CTL, y la inmunidad antitumoral se puede activar de manera más eficaz.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1-1 muestra los resultados de HPLC para los péptidos que tienen 4 epítomos unidos obtenidos en el Ejemplo 1 (TPV06, TPV10, TPV12, TPV21, TPV26, TPV30, TPV35, TPV37, TPV39, TPV40, TPV41, TPV43 y TPV45).  
 La Fig. 1-2 es una continuación de la figura 1-1.  
 La Fig. 1-3 es una continuación de la figura 1-2.  
 La Fig. 1-4 es una continuación de la figura 1-3.  
 La Fig. 1-5 es una continuación de la figura 1-4.  
 La Fig. 1-6 es una continuación de la figura 1-5.  
 La Fig. 1-7 es una continuación de la figura 1-6.  
 La Fig. 2-1 muestra los resultados de espectrometría de masas (MS) para los péptidos que tienen 4 epítomos unidos obtenidos en el Ejemplo 1 (TPV39, TPV40, TPV41, TPV43 y TPV45).  
 La Fig. 2-2 es una continuación de la figura 2-1.  
 La Fig. 2-3 es una continuación de la figura 2-2.  
 La Fig. 3-1 muestra los resultados de la inducción de CTL específicos de epítomo en modelos de ratón a los que se ha administrado el péptido que tiene 4 epítomos unidos (\*: no examinado). La Fig. 3-1 muestra además los resultados de la evaluación lograda escindiendo el péptido que tiene 4 epítomos unidos con inmunoproteasomas humanos e inspeccionando la escisión del extremo C del péptido de epítomo PEP2 o PEP10 identificado.  
 La Fig. 3-2 es una continuación de la figura 3-1.  
 La Fig. 3-3 es una continuación de la figura 3-2.  
 La Fig. 3-4 muestra los resultados de la inducción de CTL específicos de epítomo en modelos de ratón en los que se ha administrado el péptido que tiene 4 epítomos unidos que comprende una secuencia peptídica de restos de arginina en el extremo N o el péptido que tiene 4 epítomos unidos que comprende un trímero de arginina como un engarce péptido-péptido (\*: no examinado). La Fig. 3-4 muestra además los resultados de la evaluación lograda escindiendo el péptido que tiene 4 epítomos unidos con inmunoproteasomas humanos e inspeccionando la escisión del extremo C del péptido de epítomo PEP2 o PEP10 identificado.  
 La Fig. 4-1 muestra los resultados del ensayo del título de anticuerpos IgG específicos de epítomo en sueros de modelos de ratón a los que se ha administrado el péptido que tiene 4 epítomos unidos.  
 La Fig. 4-2 es una continuación de la figura 4-1.  
 La Fig. 4-3 muestra los resultados del ensayo del título de anticuerpos IgG específicos de epítomo en sueros de modelos de ratón a los que se ha administrado el péptido que tiene 4 epítomos unidos que comprende una secuencia peptídica de restos de arginina en el extremo N o el péptido que tiene 4 epítomos unidos que comprende un trímero de arginina como un engarce péptido-péptido.

**Realizaciones para llevar a cabo la invención**

A continuación, la presente invención se describe con más detalle.

1. Péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos

En la presente invención, el "péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos" significa 4 péptidos seleccionados entre los péptidos de epítomo de CTL procedentes de la misma y/o de distintas moléculas de antígenos tumorales, unidas linealmente a través de engarces como una única molécula.

El "péptido de epítomo CTL procedente de moléculas de antígenos tumorales" es un péptido que es el resultado de la descomposición de antígenos tumorales dentro de las células tumorales, y está unido a la molécula de HLA de clase

l y se presenta en la superficie celular. Por lo tanto, es reconocido por un CTL específico de tumor y/o puede inducir y/o activar CTL específicos de tumor. "Inducción de CTL específicos de tumor" se refiere a la diferenciación y/o proliferación de CTL que reconocen específicamente péptidos de epítipo de CTL procedentes de moléculas de antígenos tumorales *in vitro* o *in vivo*. Además, "activación de CTL específicos de tumor" se refiere a la producción de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y/o la manifestación de actividad citotóxica mediante la liberación de sustancias citotóxicas o similares cuando el CTL reconoce un antígeno presentado por la molécula HLA de clase I. El "péptido de epítipo CTL procedente de una molécula de antígeno tumoral" utilizado en el presente documento se denomina ocasionalmente "péptido de epítipo CTL".

Como péptidos de epítipo CTL procedentes de moléculas de antígeno tumoral, se conocen los que se muestran a continuación:

PEP1: KLVERLGAA (SEQ ID NO: 1 [documento WO 2001/011044]);  
 PEP2: ASLSDPWV (SEQ ID NO: 2 [documento WO 2002/010369]);  
 PEP3: ALVEFEDVL (SEQ ID NO: 3 [documento WO 2002/010369]);  
 PEP4: LLQAEAPRL (SEQ ID NO: 4 [documento WO 2000/12701]);  
 PEP5: DYSARWNEI (SEQ ID NO: 5 [documento JP H11-318455 A (1999)]);  
 PEP6: VYDYNCHVDL (SEQ ID NO: 6 [documento WO 2000/12701]);  
 PEP7: LYAWEPSFL (SEQ ID NO: 7 [documento JP 2000-000270A]);  
 PEP8: DYLRVLEDF (SEQ ID NO: 8 [documento WO 2001/011044]);  
 PEP9: QIRPIFSNR (SEQ ID NO: 9 [documento WO 2008/007711]);  
 PEP10: ILEQSGEWWK (SEQ ID NO: 10 [documento WO 2009/022652]);  
 PEP11: VIQNLERGYR (SEQ ID NO: 11 [documento WO 2009/022652]);  
 PEP12: KLKHYGPGWV (SEQ ID NO: 12 [documento WO 1999/067288]);  
 PEP13: RLQEWCSVI (SEQ ID NO: 13 [documento WO 2002/010369]);  
 PEP14: ILGELREKV (SEQ ID NO: 14 [documento WO 2002/010369]);  
 PEP15: DYVREHKDNI (SEQ ID NO: 15 [documento WO 2005/071075]);  
 PEP16: HYTNASDGL (SEQ ID NO: 16 [documento WO 2001/011044]);  
 PEP17: NYSVRYRPL (SEQ ID NO: 17 [documento JP 2000-000270 A]);  
 PEP18: RYLTQETNKV (SEQ ID NO: 18 [documento JP 2007-145715 A]); y  
 PEP19: TFDYLRSVL (SEQ ID NO: 19 [documento WO 2001/011044]).

PEP1, PEP2, PEP3, PEP4, PEP5, PEP8, PEP10, PEP12, PEP13, PEP14 y PEP15 están restringidos por HLA-A2 y los CTL pueden entonces inducirse y/o activarse. PEP2, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP12, PEP13, PEP15, PEP16, PEP17, PEP18 y PEP19 están restringidos por HLA-A24 y los CTL pueden entonces inducirse y/o activarse. PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP9, PEP10, PEP11, PEP12, PEP13, PEP15 y PEP16 están restringidos por HLA-A3 y los CTL pueden entonces inducirse y/o activarse. Además, PEP2 y PEP6 están restringidos por HLA-A26 y los CTL pueden entonces inducirse y/o activarse. La expresión de genes que codifican tales péptidos de epítipo CTL se observa en una pluralidad de tipos de cáncer (Yang, D. y col., Cancer Res., 1999, 59: 4056-63; Harashima, N. y col., Eur. J. Immunol., 2001, 31 (2), 323-32).

Diversos tipos de péptidos que tienen 4 epítipos de CTL unidos que se obtienen uniendo linealmente 4 tipos de péptidos de epítipo de CTL seleccionados entre 13 tipos particulares de los péptidos de epítipo de CTL descritos anteriormente a través de engarces como una única molécula pueden servir como los "péptidos que tienen 4 epítipos de CTL unidos" de acuerdo con la presente invención. Se pueden inducir y/o activar tres o más CTL específicos para péptidos de epítipo de CTL de interés. Los péptidos que no pudieran evaluarse directamente en términos de inducción específica de péptido de epítipo CTL (es decir, PEP2 y PEP10) pueden someterse a un experimento de escisión con inmunoproteasomas (Ejemplo 3), para determinar la aparición de inducción de CTL específica de péptido de epítipo. En general, se sabe que las proteínas antigénicas que se incorporan en las células presentadoras de antígeno se escinden con proteasomas o inmunoproteasomas, y se sabe que tal procedimiento es indispensable para que las proteínas antigénicas incorporadas presenten antígenos mediados por HLA (por ejemplo, Rock KL, York, I.A., Goldberg, A.L., Nat. Immunol., 2004, 5(7): 670-677). Es necesario que los péptidos de epítipo CTL se escindan en los sitios adecuados, para permitir que tales péptidos de epítipo se unan a los bolsillos del HLA. Es necesario determinar los aminoácidos C terminales de los péptidos de epítipo CTL como resultado de la escisión con proteasomas o inmunoproteasomas (Rock KL, York, I.A., Goldberg, A.L., Nat. Immunol., 2004, 5(7): 670-677). Se supuso que las células dendríticas presentarían los péptidos de epítipo CTL cuando los péptidos que tienen 4 epítipos unidos se administraran a seres humanos. Sobre la base de tal presunción, se analizaron *in vitro* los patrones de escisión de los péptidos que tienen 4 epítipos unidos utilizando inmunoproteasomas expresados en células dendríticas a niveles altos. Cuando los péptidos de epítipo CTL aparecen como resultado de la escisión con inmunoproteasomas, se puede determinar que se induce un CTL específico para tales péptidos de epítipo.

En la presente descripción, se seleccionan 4 tipos de péptidos de epítipo CTL seleccionados entre 13 tipos particulares de péptidos de epítipo CTL, opcionalmente de manera redundante, entre el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (PEP1), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (PEP2), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (PEP4), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 5 (PEP5), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 (PEP6), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 7 (PEP7), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 8 (PEP8), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 9 (PEP9), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO:

10 (PEP10), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 13 (PEP13), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 15 (PEP15), el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 17 (PEP17) y el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 18 (PEP18).

5 En la presente invención, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene la sustitución, inserción, delección y/o adición de uno o de una pluralidad de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 o PEP18, y que tiene la capacidad de inducir CTL y la capacidad de inducir producciones de inmunoglobulinas equivalentes o superiores a las del péptido original, se puede utilizar como un "péptido de epítipo CTL". El término "pluralidad" utilizado en el presente documento se refiere a 1 a 3, y preferentemente a 1 o 2. Un ejemplo de tal péptido es un péptido obtenido por sustitución de  
10 aminoácidos que tienen propiedades similares a las del aminoácido original (es decir, un péptido obtenido por sustitución conservativa de aminoácidos).

El péptido que tiene 4 epítopos de CTL unidos de acuerdo con la presente invención comprende 4 péptidos de epítipo que se seleccionan, opcionalmente de manera redundante, entre PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18, unidos linealmente a través de engarces.

15 Se puede utilizar cualquier engarce, con la condición de que se escinda tras la administración de un péptido que tiene 4 epítopos de CTL unidos a un organismo, y que los péptidos de epítipo CTL unidos se puedan separar entre sí. Los ejemplos del mismo incluyen un enlace éster, un enlace éter, un enlace amida, un engarce de cadena de azúcar, un engarce de polietilenglicol y un engarce aminoacídico. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos utilizadas como engarces aminoacídicos incluyen un dímero de arginina, un trímero de arginina, un tetrámero de arginina, un dímero de lisina, un trímero de lisina, un tetrámero de lisina, un dímero de glicina, un trímero de glicina, un tetrámero de glicina,  
20 un pentámero de glicina, un hexámero de glicina, una alanina-alanina-tirosina (AAY), isoleucina-leucina-alanina (ILA) y arginina-valina-lisina-arginina (RVKR), siendo preferible un dímero o trímero de arginina.

Los péptidos de epítipo CTL a seleccionar y las disposiciones de los mismos se pueden determinar administrando un péptido que tiene 4 epítopos unidos obtenidos mediante la síntesis de epítopos en combinaciones dadas y en un orden dado, a ratones transgénicos para HLA-A humano y evaluando la presencia de inducción de CTL específicos para péptidos de epítipo CTL *in vivo*.  
25

El péptido que tiene 4 epítopos unidos de acuerdo con la presente invención tiene las características que se especifican en la reivindicación 1. Una divulgación adicional se refiere a una o más características seleccionadas de las siguientes características (1) a (5):

- 30 (1) el péptido comprende PEP2 en el extremo C (excepto el péptido que comprende PEP7 y PEP8 en el extremo N dispuestos sucesivamente en ese orden desde el extremo N a través de un engarce);  
(2) el péptido comprende PEP4 en el extremo C;  
(3) el péptido comprende PEP10 en el extremo C;  
(4) el péptido comprende PEP6 y PEP5 en el extremo C dispuestos sucesivamente en ese orden desde el extremo  
35 N a través de un engarce; y  
(5) el péptido comprende PEP5, PEP6, PEP9 y PEP18.

Una divulgación adicional se refiere a una característica seleccionada de las siguientes características (1) a (5):

- 40 (1) el péptido comprende 3 péptidos de epítipo CTL seleccionados entre PEP1, PEP7, PEP8 y PEP13 y, en el término C, PEP2 (excepto el péptido que comprende PEP7 y PEP8 en el extremo N dispuestos sucesivamente en tal orden desde el extremo N a través de un engarce);  
(2) el péptido comprende 3 péptidos de epítipo CTL, PEP5, PEP6 y PEP9, y, en el término C, PEP4;  
(3) el péptido comprende 3 péptidos de epítipo CTL seleccionados entre PEP1, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18 y, en el término C, PEP10;  
45 (4) el péptido comprende 2 péptidos de epítipo CTL, PEP1 y PEP7, y PEP6 y PEP5 en el extremo C dispuestos sucesivamente en tal orden desde el extremo N a través de un engarce; y  
(5) el péptido comprende 3 péptidos de epítipo CTL, PEP5, PEP6 y PEP18, y, en el término C, PEP9.

Una divulgación adicional se refiere a un péptido que tiene 4 epítopos unidos que comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre las siguientes secuencias, en las que "-(L)-" representa un engarce:

- 50 - PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4 (TPV01);  
- PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4 (TPV02);  
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4 (TPV03);  
- PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4 (TPV04);  
- PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4 (TPV05);  
- PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4 (TPV06);  
55 - PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV07);  
- PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV08);  
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV09);  
- PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2 (TPV10);

- PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV11);
- PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV12);
- PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV13);
- PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2 (TPV14);
- 5 - PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2 (TPV15);
- PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2 (TPV16);
- PEP 13-(L)-PEP 15-(L)-PEP 18-(L)-PEP 10 (TPV17);
- PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV18);
- PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10 (TPV19);
- 10 - PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV20);
- PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV21);
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV22);
- PEP 1 -(L)-PEP1 5-(L)-PEP1 8-(L)-PEP10 (TPV23);
- PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV24);
- 15 - PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10 (TPV25);
- PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10 (TPV26);
- PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV27);
- PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10 (TPV28);
- PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV29);
- 20 - PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10 (TPV30);
- PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10 (TPV31);
- PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV32);
- PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10 (TPV33);
- PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10 (TPV34);
- 25 - PEP6-(L)-PEP18-(L)-PEP5-(L)-PEP9 (TPV35);
- PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP18-(L)-PEP9 (TPV36);
- PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP6-(L)-PEP5 (TPV37); y
- PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP6-(L)-PEP5 (TPV38).

El péptido que tiene 4 epítomos CTL unidos de acuerdo con la presente invención puede comprender además una secuencia peptídica que consiste en aminoácidos hidrófilos. Dicha secuencia peptídica se añadir al extremo N y/o al extremo C del péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos, y preferentemente se añade al extremo N. Dicha secuencia peptídica consiste en de 1 a 15, preferentemente de 2 a 10, y más preferentemente de 3 a 5 aminoácidos hidrófilos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, treonina, tirosina, serina, asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico. Por ejemplo, como tal secuencia peptídica se puede utilizar un trímero de arginina (RRR) o un tetrámero de arginina (RRRR). Los ejemplos de péptidos que tienen 4 epítomos de CTL unidos que comprenden tales secuencias peptídicas añadidas a los mismos incluyen RRR-TPV06, RRRR-TPV06, TPV06-RRR, TPV06-RRRR, RRR-TPV10, RRRR-TPV10, TPV10-RRR, TPV10-RRRR, RRR-TPV12, RRRR-TPV12, TPV12-RRR, TPV12-RRRR, RRR-TPV21, RRRR-TPV21, TPV21-RRR, TPV21-RRRR, RRR-TPV26, RRRR-TPV26, TPV26-RRR, TPV26-RRRR, RRR-TPV30, RRRR-TPV30, TPV30-RRR, TPV30-RRRR, KKK-TPV06, KKKK-TPV06, TPV06-KKK, TPV06-KKKK, KKK-TPV10, KKKK-TPV10, TPV10-KKK, TPV10-KKKK, KKK-TPV12, KKKK-TPV12, TPV12-KKK, TPV12-KKKK, KKK-TPV21, KKKK-TPV21, TPV21-KKK, TPV21-KKKK, KKK-TPV26, KKKK-TPV26, TPV26-KKK, TPV26-KKKK, KKK-TPV30, KKKK-TPV30, TPV30-KKK, TPV30-KKKK, HHH-TPV06, HHHH-TPV06, TPV06-HHH, TPV06-HHHH, HHH-TPV10, HHHH-TPV10, TPV10-HHH, TPV10-HHHH, HHH-TPV12, HHHH-TPV12, TPV12-HHH, TPV12-HHHH, HHH-TPV21, HHHH-TPV21, TPV21-HHH, TPV21-HHHH, HHH-TPV26, HHHH-TPV26, TPV26-HHH, TPV26-HHHH, HHH-TPV30, HHHH-TPV30, TPV30-HHH, TPV30-HHHH, RRKK-TPV12, RKRK-TPV12, RHRH-TPV12, RRHH-TPV12, KKHH-TPV12 y KHKH-TPV12, con KKK-TPV06, KKKK-TPV06, KKK-TPV10, KKKK-TPV10, KKK-TPV12, KKKK-TPV12, KKK-TPV21, KKKK-TPV21, KKK-TPV26, KKKK-TPV26, KKK-TPV30, KKKK-TPV30, HHH-TPV06, HHHH-TPV06, HHH-TPV10, HHHH-TPV10, HHH-TPV12, HHHH-TPV12, HHH-TPV21, HHHH-TPV21, HHH-TPV26, HHHH-TPV26, HHH-TPV30, HHHH-TPV30, RRKK-TPV12, RKRK-TPV12, RHRH-TPV12, RRHH-TPV12, KKHH-TPV12 y KHKH-TPV12 siendo preferibles, y RRR-TPV06, RRRR-TPV06, RRR-TPV10, RRRR-TPV10, RRR-TPV12, RRRR-TPV12, TRRR-TPV21, RRRR-TPV21, RRR-TPV26, RRRR-TPV26, RRR-TPV30 y RRRR-TPV30 siendo más preferibles. Se sabe que un péptido que comprende tal secuencia peptídica tiene una solubilidad mejorada en un disolvente acuoso (Abdelkrim Alileche y col., Peptides 38, 2012, 302-311; documento JP 2006-188507 A). Con la adición de tal secuencia peptídica al péptido que tiene 4 epítomos CTL unidos de acuerdo con la presente invención, se puede mejorar un grado de solubilidad del péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos en un disolvente acuoso.

En el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, los CTL específicos de péptido de epítomo CTL pueden inducirse y/o activarse en al menos tres tipos, y preferentemente cuatro tipos de péptidos de epítomo CTL de los 4 tipos unidos de péptidos de epítomo CTL. Además, se puede inducir la producción de una inmunoglobulina específica para cada péptido de epítomo CTL. En la presente invención, el término "inmunoglobulinas" se refiere a IgG, IgM, IgA o IgD.

El péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención puede ser una sal de adición de ácido o una sal de adición de base. Los ejemplos de ácidos que generalmente se utilizan para formar sales de adición de ácido incluyen ácidos orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido oxálico, ácido

p-bromofenilsulfónico, ácido carboxílico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y ácido trifluoroacético. Los ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales inducidas a partir de bases inorgánicas, tales como hidróxido de amonio, hidróxido alcalino, hidróxido de metal alcalinotérreo, carbonato y bicarbonato.

## 2. Producción de un péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos

5 El péptido que tiene 4 epítomos de CTL unidos de acuerdo con la presente invención puede producirse mediante técnicas comunes, por ejemplo, síntesis peptídica, tal como síntesis en fase líquida o síntesis en fase sólida, o síntesis peptídica que implica el uso de un sintetizador de péptidos automatizado (Kelley y col., *Genetics Engineering Principles and Methods*, Setlow, J. K. eds., Plenum Press NY., 1990, Vol. 12, pág. 1-19; Stewart y col., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 1989, W. H. Freeman Co.; Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 1985, 82: pág. 5132, "Shin Seikagaku Jikken Kouza (New Biochemical Experiment) 1, Protein IV, 1992, the Japanese Biochemical Society (ed.), Tokio Kagaku Doujin). La síntesis peptídica se lleva a cabo preparando aminoácidos en que los grupos funcionales a unir de los aminoácidos distintos de los grupos  $\alpha$ -amino y grupos  $\alpha$ -carboxilo están protegidos, y formando enlaces peptídicos entre los grupos  $\alpha$ -amino y los grupos  $\alpha$ -carboxilo de los aminoácidos. En general, un grupo carboxilo de un resto de aminoácido ubicado en el extremo C de un péptido está unido a una fase sólida a través de un espaciador o engarce adecuado. Se elimina selectivamente un grupo protector en el extremo amino del dipéptido obtenido anteriormente y se forma un enlace peptídico entre el extremo amino y el grupo  $\alpha$ -carboxilo del resto de aminoácido posterior. Este procedimiento se continúa para producir un péptido con un grupo lateral protegido, y todos los grupos protectores se eliminan y se separan de la fase sólida al final. Los tipos de grupos protectores, los procedimientos para proteger el mismo y los procedimientos de unión a péptidos se describen en detalle en los documentos mencionados anteriormente.

Como alternativa, se puede producir un péptido mediante recombinación genética, presentación en fagos u otras técnicas, con el uso de un ácido nucleico que codifica el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención.

25 Una técnica de recombinación genética comprende insertar ADN que codifica el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención en un vector de expresión adecuado, introducir el vector en células hospedadoras adecuadas, cultivar las células y recuperar los péptidos diana de las células o del líquido extracelular. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores plasmídicos, de fago, cósmido, de fagémido y de virus. Los vectores se introducen en las células hospedadoras, tales como células hospedadoras bacterianas (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*), células de levadura, células de insecto, células animales (por ejemplo, células de mamíferos) y células vegetales. La transformación o transfección en tales células se lleva a cabo a través de, por ejemplo, el procedimiento de fosfato de calcio, electroporación, lipofección, el procedimiento de pistola de partículas o el procedimiento con PEG. Las células transformadas se cultivan en conformidad con una técnica convencional para el cultivo de organismos hospedadores. Para facilitar la recuperación del péptido de acuerdo con la presente invención, es preferible que un péptido generado a través de expresión se secrete de forma extracelular. Con este fin, el ADN que codifica una secuencia peptídica que permite la secreción del péptido a partir de las células se une al lado 5' terminal del ADN que codifica un péptido diana. Como alternativa, se puede recuperar un péptido diana acumulado en las células. En dicho caso, las células se rompen física o químicamente y se recupera un péptido diana a través de una técnica de purificación de proteínas.

40 El péptido así obtenido puede recuperarse o purificarse a través de una técnica convencional, por ejemplo, técnicas de cromatografía, tal como la cromatografía de filtración en gel, cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía en columna de fase inversa, o HPLC, fraccionamiento en sulfato de amonio, ultrafiltración o inmunoadsorción.

## 3. Linfocitos T citotóxicos

45 Con el uso del péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, Se pueden obtener CTL específicos de péptido de epítomo CTL que dañan células cancerosas *in vitro* y/o *ex vivo*. Se conoce un procedimiento para inducir CTL utilizando un péptido de epítomo CTL *in vitro* y/o *ex vivo* es conocido (por ejemplo, el documento JP 2006-14637 A), y tal técnica puede emplearse en la presente invención. Por ejemplo, células de adhesión en placa de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de individuos sanos o de pacientes con cáncer se cultivan en presencia de citocinas, tales como GM-CSF o IL-4, para inducir células dendríticas (las CD). Después de pulsar las células dendríticas con el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, se aplican rayos X a las mismas, para preparar células presentadoras de antígeno (estimulantes). Cuando no se pueden utilizar las CD, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de individuos sanos o de los mismos pacientes con cáncer pueden pulsarse con el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, se pueden aplicar rayos X a los mismos y se puede utilizar las células. Posteriormente, se añaden células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de individuos sanos o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de pacientes con cáncer o linfocitos en los ganglios linfáticos pertinentes (es decir, respondedores) y luego se cultivan en presencia de citocinas, tales como IL-2, IL-4 o IL-7. Después de eso, las células presentadoras de antígeno obtenidas mediante pulsado descritas anteriormente se estimulan nuevamente con la adición del péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención y se cultivan adicionalmente en presencia de citocinas, tales como IL-2.

Cualquier medio en el que los linfocitos T puedan sobrevivir puede utilizarse como el medio de cultivo celular utilizado para la inducción de CTL. Por ejemplo, se puede utilizar medio preparado mediante la adición de diversas citocinas (por ejemplo, IL-2) y de suero de ternera fetal (STF) al medio RHAM $\alpha$  (medio LAK descrito en Kawai, K., Sasaki, T., Saijo-Kurita, K., Akaza, H., Koiso, K. y Ohno, T., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35, 225-229, 1992), medio AIMV (GIBCO BRL, Life Technologies, INC.) o medio RPMI 1640.

El cultivo puede realizarse en condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la temperatura de cultivo es de 33 °C a 41 °C y preferentemente de 37 °C. Se puede utilizar como fase gaseosa un gas inerte que contiene aire u oxígeno de concentración adecuada y dióxido de carbono de concentración adecuada (por ejemplo, CO<sub>2</sub> al 5 %) para ajustar el pH del medio a aproximadamente 7,4. El cultivo se realiza preferentemente durante 4 a 10 días, y más preferentemente 7 días u 8 días. Algunos CTL inducidos a través de tal cultivo son péptidos de epítipo CTL específicos para cada uno de al menos tres tipos, y preferentemente cuatro tipos, de péptidos de epítipo CTL entre los cuatro tipos de péptidos de epítipo CTL que constituyen el péptido que tiene 4 epítipos unidos, y por lo tanto pueden dañar células cancerosas de forma específica.

#### 4. Composición farmacéutica

El péptido que tiene 4 epítipos unidos de acuerdo con la presente invención puede utilizarse como principio activo de una composición farmacéutica utilizada para inmunoterapia contra el cáncer.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener, como principio activo (o principios activos), uno o más de los péptidos que tienen 4 epítipos unidos. Al incluir una pluralidad de péptidos que tienen 4 epítipos unidos, se pueden esperar efectos más fuertes. Además, la composición farmacéutica resultante puede ejercer una mayor versatilidad, de modo que pueda administrarse como una vacuna peptídica para el cáncer a una variedad más amplia de pacientes con cáncer, independientemente de los tipos de HLA de los pacientes.

Los genes que codifican PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18 incluidos en el péptido que tiene 4 epítipos unidos de acuerdo con la presente invención se observa que se expresan en una pluralidad de tipos de cánceres sólidos y cánceres hemáticos. Los ejemplos de cánceres sólidos incluyen tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer gástrico, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI), cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de las vías biliares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, melanoma maligno, cáncer de piel, cáncer de lengua, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, liposarcoma, angiosarcoma, rabdomioblastoma y liomiosarcoma. Los ejemplos de cánceres hemáticos incluyen leucemia, linfoma maligno y mieloma. Por consiguiente, el péptido que tiene 4 epítipos unidos de acuerdo con la presente invención es útil para el tratamiento y/o la prevención de tales cánceres. La expresión "tratamiento y/o prevención del cáncer" utilizado en el presente documento se refiere a la prevención del desarrollo/recidiva del cáncer, supresión de la progresión/agravamiento del cáncer, o la mejora de las afecciones cancerosas.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener materiales farmacéuticamente aceptables, tales como diversos vehículos orgánicos o inorgánicos comunes. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos que pueden utilizarse incluyen estabilizantes, antibacterianos, tampones, agentes de isotonicidad, agentes quelantes, ajustadores de pH, tensioactivos, cargas, espesantes, aglutinantes, humectantes, disgregantes, agentes tensioactivos, lubricantes, agentes calmantes, diluyentes y excipientes que generalmente se utilizan en conformidad con la forma de administración de las preparaciones farmacéuticas pertinentes. Las preparaciones farmacéuticas se preparan preferentemente en forma de formulaciones complementadas con tales vehículos en conformidad con técnicas convencionales.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener un adyuvante conocido que se utiliza en el momento de la administración de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund (ACF), adyuvante incompleto de Freund (AIF), alumbre, lípido A, monofosforil lípido A, preparaciones bacterianas tales como BCG (*Bacilo de Calmette-Guerrin*), ácidos nucleicos tales como CpG-ADN y ARNbc, preparaciones de componentes bacterianos tales como tuberculina, polímeros de origen natural, tales como hemocianina de lapa californiana y manano de levadura, muramil-tripéptido, muramil-dipéptido o un derivado de cualquiera de los mismos, alumbre, copolímeros de bloque no iónicos y citocinas tales como interleucina 2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). Estos adyuvantes se pueden utilizar solos o en combinaciones de dos o más. Los adyuvantes pueden administrarse simultáneamente con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en forma de una mezcla o como una emulsión.

Además del péptido que tiene 4 epítipos unidos, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más de un péptido de epítipo CTL conocido procedente de moléculas de antígenos tumorales, un péptido que contiene a los mismos, o un péptido que comprende los péptidos de epítipo CTL unidos entre sí (en lo sucesivo en el presente documento, denominados "péptidos de epítipo CTL conocidos procedentes de moléculas de antígenos tumorales"). Los ejemplos de péptidos de epítipo CTL conocidos procedentes de moléculas de antígenos tumorales, pero sin limitación, WT-1 p126-134, WT-1 p235-243 modificado (M236Y), NY-ESO-1 p157-

165, gp100 p209-217 modificado (T210M), survivina-2B p80-88, Her-2/neu p63-71, VEGFR2 p169-177, MART-1 p26-35, Glipicano-3 p298-306 y SPARC p143-151. En este caso, el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención y los péptidos de epítomo CTL conocidos procedentes de moléculas de antígenos tumorales pueden prepararse en forma de una preparación de agente único. Como alternativa, una preparación que comprende, como principio activo, el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, puede separarse de una preparación que comprende, como principio activo, los péptidos de epítomo CTL conocidos procedentes de moléculas de antígenos tumorales.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar en conformidad con la forma de administración. Los ejemplos representativos de formas de dosificación incluyen, pero sin limitación, preparaciones líquidas, emulsiones, preparaciones de liposomas, emulsiones lipídicas, complejos de inclusión de ciclodextrina, suspensiones, pomadas, cremas, agentes absorbidos por vía transdérmica, agentes absorbidos por vía transmucosa, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, fármacos en polvo, gránulos, gránulos finos y jarabes. De acuerdo con la vía de administración, tales formas de dosificación se clasifican además como, por ejemplo, preparaciones orales, preparaciones parenterales, preparaciones transnasales, preparaciones transvaginales, supositorios, formulaciones sublinguales, inhalantes, colirios o gotas para los oídos, y tales preparaciones se pueden combinar, moldear o preparar en conformidad con técnicas convencionales. Además de la aplicación en forma de preparaciones líquidas, tal preparación puede someterse a liofilización, para hacer que la preparación farmacéutica sea almacenable. Cuando se usa tal preparación farmacéutica, se puede disolver con la ayuda de, por ejemplo, un tampón que contenga agua y solución salina fisiológica, para la concentración de la misma a un nivel adecuado.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender, como principio activo, CTL inducidos *in vitro* y/o *ex vivo* con el uso del péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención. Dicha composición farmacéutica está preferentemente en forma de un agente parenteral.

#### 5. Procedimientos de tratamiento

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar a una amplia diversidad de pacientes de cáncer, tales como pacientes que son positivos para los tipos de HLA seleccionados del grupo que consiste en supertipo HLA-A2, HLA-A24, HLA-A26 y HLA-A3, y el tratamiento puede iniciarse sin realizar el tipado de HLA antes del tratamiento.

Cuando la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administra a un paciente con cáncer, pueden inducirse y/o activarse los CTL específicos para al menos tres, y preferentemente cuatro tipos de péptidos de epítomo CTL que constituyen el péptido que tiene 4 epítomos unidos como principio activo de la composición farmacéutica. Además, se puede inducir la producción de inmunoglobulinas específicas para los péptidos de epítomo CTL de interés. El nivel de inducción de la producción de inmunoglobulinas tras la administración del péptido que tiene 4 epítomos unidos como principio activo es significativamente mayor que el nivel de inducción de la producción de inmunoglobulinas observado tras la administración de una mezcla de los péptidos de epítomo CTL que han de estar contenidos en el péptido que tiene 4 epítomos unidos, pero que no están unidos entre sí. Por consiguiente, el péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención puede tratar y/o prevenir el cáncer en un paciente con cáncer de forma eficaz.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede administrar a través de, por ejemplo, administración oral, administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intracutánea, administración sublingual, administración intraperitoneal, administración intrarrectal, administración transdérmica, administración transmucosa, administración transnasal, administración transvaginal, administración transocular o aspiración. Cuando las preparaciones comprenden, como principios activos, una pluralidad de péptidos que tienen 4 epítomos unidos o péptidos de epítomo CTL conocidos procedentes de moléculas de antígenos tumorales, se preparan en forma de composiciones farmacéuticas separadas, tales composiciones farmacéuticas pueden administrarse simultáneamente o no simultáneamente a través de la misma vía o por vías distintas.

La dosificación de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ajustarse adecuadamente en conformidad con factores tales como el cuadro clínico/gravedad del cáncer a tratar, la edad del paciente o el peso corporal del paciente. Por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene el péptido que tiene 4 epítomos unidos en una cantidad de 0,0001 mg a 1000 mg, preferentemente de 0,001 mg a 100 mg, y más preferentemente de 0,01 mg a 50 mg, puede administrarse repetidamente una vez cada varios días, varias semanas o varios meses. Cuando la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende, como principios activos, CTL inducidos *in vitro* y/o *ex vivo* con el uso del péptido que tiene 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención, es preferible administrar de  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^8$  CTL por kg de peso corporal todos los días a intervalos de 1 a 2 semanas.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse a un paciente con cáncer en combinación con productos farmacéuticos que generalmente se utilizan para quimioterapia contra el cáncer. Los ejemplos de tales productos farmacéuticos incluyen: agentes alquilantes, tales como la ciclofosfamida, temozolomida y bendamustina; antimetabolitos, tal como el tegafur-uracilo, tegafur-gimeracil-oteracil potasio, metotrexato y

gemcitabina; fármacos que contienen platino, tales como cisplatino y oxaliplatino; preparaciones de alcaloides vegetales, tales como irinotecán, eribulina, paclitaxel, docetaxel y vincristina; antibióticos carcinostáticos, tales como doxorrubicina, bleomicina y actinomicina D; fármacos dirigidos a moléculas, tales como imatinib, sunitinib, gefitinib, sorafenib, everólimus, trastuzumab, bevacizumab, rituximab, cetuximab, panitumumab y mogamulizumab; agentes de terapia hormonal, tales como bicalutamida, estramustina y exemestano; y agentes inmunoestimulantes, tales como lentinano, Picibanil y Krestina. Dichos productos farmacéuticos pueden administrarse simultáneamente o no simultáneamente con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, a través de la misma vía o a través de vías distintas.

A continuación, la presente invención se describe con mayor detalle con referencia a los ejemplos, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Síntesis y purificación de péptidos**

Los péptidos de epítipo CTL y los péptidos que tienen 4 epítopos unidos se sintetizaron utilizando un sintetizador de péptidos disponible en el mercado (Prelude, Protein Technologies, Inc.) mediante el procedimiento de síntesis en fase sólida (Fmoc). En concreto, se permitió que la resina de Alko-PEG adsorbiera aminoácidos con grupos activos protegidos, se inyectó una solución de desbloqueo, para eliminar grupos protectores, se inyectaron aminoácidos con grupos activos protegidos, y se les permitió reaccionar entre ellos, para sintetizar dipéptidos. Al repetir tal procedimiento, se sintetizaron los péptidos que comprenden las secuencias de interés. Los grupos protectores de los péptidos se eliminaron realizando una reacción en una solución desprotectora que contenía triisopropilsilano al 2,5 %, 2,5 % de agua y ácido trifluoroacético al 95 % durante 2 horas. Con la adición de éter frío al filtrado resultante, los péptidos se recuperaron en forma de precipitados. Los diversos péptidos sintéticos resultantes se purificaron utilizando la columna YMC-Pack Pro C18 (YMC Co., Ltd.) y el sistema de HPLC (Gilson) con una solución acuosa de TFA al 0,1 % y acetonitrilo como fase móvil. Después del procedimiento final de purificación, se analizaron la pureza y el peso molecular de los péptidos mediante los sistemas de LC-MS (sistema Waters Acquity UPLC, micro masa ZQ). Los péptidos se liofilizaron, se conservaron a temperatura fresca en oscuridad, y luego se sometieron a los ejemplos descritos a continuación. Las tablas 1-1 a 1-8 muestran los datos espectrales de MS de los péptidos que tienen 4 epítopos unidos (TPV01 a TPV45). Las Figs. 1-1 a 1-7 muestran los datos de LC de TPV06, TPV10, TPV12, TPV21, TPV26, TPV30, TPV35, TPV37, TPV39, TPV40, TPV41, TPV43 y TPV45. La Fig. 2-1 a 2-3 muestra los datos de MS de TPV39, TPV40, TPV41, TPV43 y TPV45.

30

Tabla 1-1

Datos de MS					
Péptido	Peso molecular	Calculado		Medido	
TPV01		4 iones H+	1355,5	4 iones H+	1355,8
		5 iones H+	1084,4	5 iones H+	1084,9
		6 iones H+	903,8	6 iones H+	904,1
		7 iones H+	774,9	7 iones H+	ND
		8 iones H+	678,1	8 iones H+	678,3
TPV02		4 iones H+	1355,5	4 iones H+	1355,5
		5 iones H+	1084,4	5 iones H+	1084,3
		6 iones H+	903,8	6 iones H+	904,1
		7 iones H+	774,9	7 iones H+	775,2
		8 iones H+	678,1	8 iones H+	ND
TPV03	5417,1	4 iones H+	1355,5	4 iones H+	1355,9
		5 iones H+	1084,4	5 iones H+	1084,7
		6 iones H+	903,8	6 iones H+	904,2
		7 iones H+	774,9	7 iones H+	775,2
		8 iones H+	678,1	8 iones H+	678,2

(continuación)

Datos de MS					
Péptido	Peso molecular	Calculado		Medido	
TPV04		4 iones H <sup>+</sup>	1355,5	4 iones H <sup>+</sup>	1355,6
		5 iones H <sup>+</sup>	1084,4	5 iones H <sup>+</sup>	1084,5
		6 iones H <sup>+</sup>	903,8	6 iones H <sup>+</sup>	904,2
		7 iones H <sup>+</sup>	774,9	7 iones H <sup>+</sup>	775,0
		8 iones H <sup>+</sup>	678,1	8 iones H <sup>+</sup>	678,8
TPV05		4 iones H <sup>+</sup>	1355,5	4 iones H <sup>+</sup>	1355,7
		5 iones H <sup>+</sup>	1084,4	5 iones H <sup>+</sup>	1084,7
		6 iones H <sup>+</sup>	903,8	6 iones H <sup>+</sup>	904,2
		7 iones H <sup>+</sup>	774,9	7 iones H <sup>+</sup>	775,1
		8 iones H <sup>+</sup>	678,1	8 iones H <sup>+</sup>	678,4
TPV06		4 iones H <sup>+</sup>	1355,5	4 iones H <sup>+</sup>	1354,4
		5 iones H <sup>+</sup>	1084,4	5 iones H <sup>+</sup>	1084,2
		6 iones H <sup>+</sup>	903,8	6 iones H <sup>+</sup>	903,5
		7 iones H <sup>+</sup>	774,9	7 iones H <sup>+</sup>	774,6
		8 iones H <sup>+</sup>	678,1	8 iones H <sup>+</sup>	ND

Tabla 1-2

TPV07		4 iones H <sup>+</sup>	1303,5	4 iones H <sup>+</sup>	1304,3
		5 iones H <sup>+</sup>	1043,0	5 iones H <sup>+</sup>	1043,3
		6 iones H <sup>+</sup>	869,3	6 iones H <sup>+</sup>	869,8
		7 iones H <sup>+</sup>	745,3	7 iones H <sup>+</sup>	745,7
		8 iones H <sup>+</sup>	652,2	8 iones H <sup>+</sup>	652,5
TPV08		4 iones H <sup>+</sup>	1303,5	4 iones H <sup>+</sup>	1303,8
		5 iones H <sup>+</sup>	1043,0	5 iones H <sup>+</sup>	1043,5
		6 iones H <sup>+</sup>	869,3	6 iones H <sup>+</sup>	870,2
		7 iones H <sup>+</sup>	745,3	7 iones H <sup>+</sup>	745,2
		8 iones H <sup>+</sup>	652,2	8 iones H <sup>+</sup>	649,5
TPV09	5209,9	4 iones H <sup>+</sup>	1303,5	4 iones H <sup>+</sup>	1304,1
		5 iones H <sup>+</sup>	1043,0	5 iones H <sup>+</sup>	1043,5
		6 iones H <sup>+</sup>	869,3	6 iones H <sup>+</sup>	869,8
		7 iones H <sup>+</sup>	745,3	7 iones H <sup>+</sup>	745,5
		8 iones H <sup>+</sup>	652,2	8 iones H <sup>+</sup>	652,7
TPV10		4 iones H <sup>+</sup>	1303,5	4 iones H <sup>+</sup>	1304,0
		5 iones H <sup>+</sup>	1043,0	5 iones H <sup>+</sup>	1043,4
		6 iones H <sup>+</sup>	869,3	6 iones H <sup>+</sup>	869,6
		7 iones H <sup>+</sup>	745,3	7 iones H <sup>+</sup>	745,7
		8 iones H <sup>+</sup>	652,2	8 iones H <sup>+</sup>	670,7

ES 2 796 301 T3

(continuación)

TPV11		4 iones H <sup>+</sup>	1303,5	4 iones H <sup>+</sup>	1304,1
		5 iones H <sup>+</sup>	1043,0	5 iones H <sup>+</sup>	1043,4
		6 iones H <sup>+</sup>	869,3	6 iones H <sup>+</sup>	869,7
		7 iones H <sup>+</sup>	745,3	7 iones H <sup>+</sup>	745,6
		8 iones H <sup>+</sup>	652,2	8 iones H <sup>+</sup>	652,6

Tabla 1-3

TPV12		4 iones H <sup>+</sup>	1347,8	4 iones H <sup>+</sup>	1347,6
		5 iones H <sup>+</sup>	1087,4	5 iones H <sup>+</sup>	1078,1
		6 iones H <sup>+</sup>	898,9	6 iones H <sup>+</sup>	898,7
		7 iones H <sup>+</sup>	770,6	7 iones H <sup>+</sup>	770,2
		8 iones H <sup>+</sup>	674,4	8 iones H <sup>+</sup>	ND
TPV13		4 iones H <sup>+</sup>	1347,8	4 iones H <sup>+</sup>	1348,5
		5 iones H <sup>+</sup>	1087,4	5 iones H <sup>+</sup>	1079,1
		6 iones H <sup>+</sup>	898,9	6 iones H <sup>+</sup>	899,3
		7 iones H <sup>+</sup>	770,6	7 iones H <sup>+</sup>	771,6
		8 iones H <sup>+</sup>	674,4	8 iones H <sup>+</sup>	674,1
TPV14	5387,1	4 iones H <sup>+</sup>	1347,8	4 iones H <sup>+</sup>	1348,5
		5 iones H <sup>+</sup>	1087,4	5 iones H <sup>+</sup>	1079,1
		6 iones H <sup>+</sup>	898,9	6 iones H <sup>+</sup>	899,5
		7 iones H <sup>+</sup>	770,6	7 iones H <sup>+</sup>	770,9
		8 iones H <sup>+</sup>	674,4	8 iones H <sup>+</sup>	674,7
TPV15		4 iones H <sup>+</sup>	1347,8	4 iones H <sup>+</sup>	1349,1
		5 iones H <sup>+</sup>	1087,4	5 iones H <sup>+</sup>	1079,0
		6 iones H <sup>+</sup>	898,9	6 iones H <sup>+</sup>	899,3
		7 iones H <sup>+</sup>	770,6	7 iones H <sup>+</sup>	771,2
		8 iones H <sup>+</sup>	674,4	8 iones H <sup>+</sup>	677,0
TPV16		4 iones H <sup>+</sup>	1347,8	4 iones H <sup>+</sup>	1348,6
		5 iones H <sup>+</sup>	1087,4	5 iones H <sup>+</sup>	1079,8
		6 iones H <sup>+</sup>	898,9	6 iones H <sup>+</sup>	899,7
		7 iones H <sup>+</sup>	770,6	7 iones H <sup>+</sup>	ND
		8 iones H <sup>+</sup>	674,4	8 iones H <sup>+</sup>	ND

ES 2 796 301 T3

Tabla 1-4

TPV17	5831,6	4 iones H <sup>+</sup>	1458,9	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1167,3	5 iones H <sup>+</sup>	1168,1
		6 iones H <sup>+</sup>	972,9	6 iones H <sup>+</sup>	973,9
		7 iones H <sup>+</sup>	834,1	7 iones H <sup>+</sup>	834,3
		8 iones H <sup>+</sup>	730,0	8 iones H <sup>+</sup>	730,3
TPV18		4 iones H <sup>+</sup>	1458,9	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1167,3	5 iones H <sup>+</sup>	1168,3
		6 iones H <sup>+</sup>	972,9	6 iones H <sup>+</sup>	973,3
		7 iones H <sup>+</sup>	834,1	7 iones H <sup>+</sup>	ND
		8 iones H <sup>+</sup>	730,0	8 iones H <sup>+</sup>	722,6
TPV19		4 iones H <sup>+</sup>	1458,9	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1167,3	5 iones H <sup>+</sup>	1167,8
		6 iones H <sup>+</sup>	972,9	6 iones H <sup>+</sup>	973,4
		7 iones H <sup>+</sup>	834,1	7 iones H <sup>+</sup>	834,4
		8 iones H <sup>+</sup>	730,0	8 iones H <sup>+</sup>	730,3
TPV20		4 iones H <sup>+</sup>	1458,9	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1167,3	5 iones H <sup>+</sup>	1167,9
		6 iones H <sup>+</sup>	972,9	6 iones H <sup>+</sup>	973,1
		7 iones H <sup>+</sup>	834,1	7 iones H <sup>+</sup>	834,2
		8 iones H <sup>+</sup>	730,0	8 iones H <sup>+</sup>	730,2
TPV21	4 iones H <sup>+</sup>	1458,9	4 iones H <sup>+</sup>	-	
	5 iones H <sup>+</sup>	1167,3	5 iones H <sup>+</sup>	1167,8	
	6 iones H <sup>+</sup>	972,9	6 iones H <sup>+</sup>	973,3	
	7 iones H <sup>+</sup>	834,1	7 iones H <sup>+</sup>	834,4	
	8 iones H <sup>+</sup>	730,0	8 iones H <sup>+</sup>	730,3	
TPV22	4 iones H <sup>+</sup>	1458,9	4 iones H <sup>+</sup>	ND	
	5 iones H <sup>+</sup>	1167,3	5 iones H <sup>+</sup>	1168,0	
	6 iones H <sup>+</sup>	972,9	6 iones H <sup>+</sup>	965,4	
	7 iones H <sup>+</sup>	834,1	7 iones H <sup>+</sup>	ND	
	8 iones H <sup>+</sup>	730,0	8 iones H <sup>+</sup>	719,4	

Tabla 1-5

TPV23	4 iones H <sup>+</sup>	1414,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
	5 iones H <sup>+</sup>	1131,9	5 iones H <sup>+</sup>	1132,7
	6 iones H <sup>+</sup>	943,4	6 iones H <sup>+</sup>	944,0
	7 iones H <sup>+</sup>	808,8	7 iones H <sup>+</sup>	809,2
	8 iones H <sup>+</sup>	707,8	8 iones H <sup>+</sup>	708,8

(continuación)

TPV24	5654,4	4 iones H <sup>+</sup>	1414,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1131,9	5 iones H <sup>+</sup>	1132,5
		6 iones H <sup>+</sup>	943,4	6 iones H <sup>+</sup>	944,8
		7 iones H <sup>+</sup>	808,8	7 iones H <sup>+</sup>	809,4
		8 iones H <sup>+</sup>	707,8	8 iones H <sup>+</sup>	ND
TPV25		4 iones H <sup>+</sup>	1414,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1131,9	5 iones H <sup>+</sup>	1132,5
		6 iones H <sup>+</sup>	943,4	6 iones H <sup>+</sup>	944,2
		7 iones H <sup>+</sup>	808,8	7 iones H <sup>+</sup>	809,2
		8 iones H <sup>+</sup>	707,8	8 iones H <sup>+</sup>	708,2
TPV26		4 iones H <sup>+</sup>	1414,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1131,9	5 iones H <sup>+</sup>	1131,6
		6 iones H <sup>+</sup>	943,4	6 iones H <sup>+</sup>	943,5
		7 iones H <sup>+</sup>	808,8	7 iones H <sup>+</sup>	808,6
		8 iones H <sup>+</sup>	707,8	8 iones H <sup>+</sup>	707,7
TPV27		4 iones H <sup>+</sup>	1414,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1131,9	5 iones H <sup>+</sup>	1132,5
		6 iones H <sup>+</sup>	943,4	6 iones H <sup>+</sup>	944,3
		7 iones H <sup>+</sup>	808,8	7 iones H <sup>+</sup>	809,4
		8 iones H <sup>+</sup>	707,8	8 iones H <sup>+</sup>	708,4
TPV28	4 iones H <sup>+</sup>	1414,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND	
	5 iones H <sup>+</sup>	1131,9	5 iones H <sup>+</sup>	1133,1	
	6 iones H <sup>+</sup>	943,4	6 iones H <sup>+</sup>	939,1	
	7 iones H <sup>+</sup>	808,8	7 iones H <sup>+</sup>	ND	
	8 iones H <sup>+</sup>	707,8	8 iones H <sup>+</sup>	ND	

Tabla 1-6

TPV29	4 iones H <sup>+</sup>	1452,2	4 iones H <sup>+</sup>	ND
	5 iones H <sup>+</sup>	1161,9	5 iones H <sup>+</sup>	1163,0
	6 iones H <sup>+</sup>	968,4	6 iones H <sup>+</sup>	969,1
	7 iones H <sup>+</sup>	830,2	7 iones H <sup>+</sup>	837,0
	8 iones H <sup>+</sup>	726,6	8 iones H <sup>+</sup>	ND
TPV30	4 iones H <sup>+</sup>	1452,2	4 iones H <sup>+</sup>	ND
	5 iones H <sup>+</sup>	1161,9	5 iones H <sup>+</sup>	1164,0
	6 iones H <sup>+</sup>	968,4	6 iones H <sup>+</sup>	968,9
	7 iones H <sup>+</sup>	830,2	7 iones H <sup>+</sup>	825,3
	8 iones H <sup>+</sup>	726,6	8 iones H <sup>+</sup>	ND

ES 2 796 301 T3

(continuación)

TPV31	5804,6	4 iones H <sup>+</sup>	1452,2	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1161,9	5 iones H <sup>+</sup>	1163,6
		6 iones H <sup>+</sup>	968,4	6 iones H <sup>+</sup>	969,1
		7 iones H <sup>+</sup>	830,2	7 iones H <sup>+</sup>	830,7
		8 iones H <sup>+</sup>	726,6	8 iones H <sup>+</sup>	ND
TPV32		4 iones H <sup>+</sup>	1452,2	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1161,9	5 iones H <sup>+</sup>	1163,0
		6 iones H <sup>+</sup>	968,4	6 iones H <sup>+</sup>	969,2
		7 iones H <sup>+</sup>	830,2	7 iones H <sup>+</sup>	830,5
		8 iones H <sup>+</sup>	726,6	8 iones H <sup>+</sup>	727,0
TPV33		4 iones H <sup>+</sup>	1452,2	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1161,9	5 iones H <sup>+</sup>	1162,7
		6 iones H <sup>+</sup>	968,4	6 iones H <sup>+</sup>	969,1
		7 iones H <sup>+</sup>	830,2	7 iones H <sup>+</sup>	830,7
		8 iones H <sup>+</sup>	726,6	8 iones H <sup>+</sup>	727,2
TPV34		4 iones H <sup>+</sup>	1452,2	4 iones H <sup>+</sup>	ND
	5 iones H <sup>+</sup>	1161,9	5 iones H <sup>+</sup>	1171,8	
	6 iones H <sup>+</sup>	968,4	6 iones H <sup>+</sup>	969,5	
	7 iones H <sup>+</sup>	830,2	7 iones H <sup>+</sup>	ND	
	8 iones H <sup>+</sup>	726,6	8 iones H <sup>+</sup>	726,8	

Tabla 1-7

TPV35	5658,3	4 iones H <sup>+</sup>	1415,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1132,7	5 iones H <sup>+</sup>	1133,3
		6 iones H <sup>+</sup>	944,1	6 iones H <sup>+</sup>	ND
		7 iones H <sup>+</sup>	809,3	7 iones H <sup>+</sup>	808,6
		8 iones H <sup>+</sup>	708,3	8 iones H <sup>+</sup>	ND
TPV36		4 iones H <sup>+</sup>	1415,6	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1132,7	5 iones H <sup>+</sup>	1133,1
		6 iones H <sup>+</sup>	944,1	6 iones H <sup>+</sup>	944,3
		7 iones H <sup>+</sup>	809,3	7 iones H <sup>+</sup>	810,0
		8 iones H <sup>+</sup>	708,3	8 iones H <sup>+</sup>	708,6
TPV37	5358	4 iones H <sup>+</sup>	1340,5	4 iones H <sup>+</sup>	1340,8
		5 iones H <sup>+</sup>	1072,6	5 iones H <sup>+</sup>	1072,7
		6 iones H <sup>+</sup>	894,0	6 iones H <sup>+</sup>	ND
		7 iones H <sup>+</sup>	766,4	7 iones H <sup>+</sup>	766,4
		8 iones H <sup>+</sup>	670,8	8 iones H <sup>+</sup>	671,0

ES 2 796 301 T3

(continuación)

TPV38		4 iones H <sup>+</sup>	1340,5	4 iones H <sup>+</sup>	1340,7
		5 iones H <sup>+</sup>	1072,6	5 iones H <sup>+</sup>	1072,9
		6 iones H <sup>+</sup>	894,0	6 iones H <sup>+</sup>	894,1
		7 iones H <sup>+</sup>	766,4	7 iones H <sup>+</sup>	766,9
		8 iones H <sup>+</sup>	670,8	8 iones H <sup>+</sup>	670,7
TPV39	5855,6	4 iones H <sup>+</sup>	1464,9	4 iones H <sup>+</sup>	1465,7
		5 iones H <sup>+</sup>	1172,1	5 iones H <sup>+</sup>	1172,8
		6 iones H <sup>+</sup>	976,9	6 iones H <sup>+</sup>	977,5
		7 iones H <sup>+</sup>	837,5	7 iones H <sup>+</sup>	838,0
		8 iones H <sup>+</sup>	733,0	8 iones H <sup>+</sup>	733,4
TPV40	6011,8	4 iones H <sup>+</sup>	1504,0	4 iones H <sup>+</sup>	1504,7
		5 iones H <sup>+</sup>	1203,4	5 iones H <sup>+</sup>	1204,0
		6 iones H <sup>+</sup>	1003,0	6 iones H <sup>+</sup>	1003,5
		7 iones H <sup>+</sup>	859,8	7 iones H <sup>+</sup>	860,3
		8 iones H <sup>+</sup>	752,5	8 iones H <sup>+</sup>	752,8
TPV41	5855,6	4 iones H <sup>+</sup>	1464,9	4 iones H <sup>+</sup>	1465,4
		5 iones H <sup>+</sup>	1172,1	5 iones H <sup>+</sup>	1172,6
		6 iones H <sup>+</sup>	976,9	6 iones H <sup>+</sup>	977,3
		7 iones H <sup>+</sup>	837,5	7 iones H <sup>+</sup>	837,8
		8 iones H <sup>+</sup>	733,0	8 iones H <sup>+</sup>	733,2

Tabla 1-8

TPV42	5885,7	4 iones H <sup>+</sup>	1472,4	4 iones H <sup>+</sup>	1473,2
		5 iones H <sup>+</sup>	1178,1	5 iones H <sup>+</sup>	1178,8
		6 iones H <sup>+</sup>	982,0	6 iones H <sup>+</sup>	982,5
		7 iones H <sup>+</sup>	841,8	7 iones H <sup>+</sup>	842,3
		8 iones H <sup>+</sup>	736,7	8 iones H <sup>+</sup>	737,1
TPV43	6041,9	4 iones H <sup>+</sup>	1511,5	4 iones H <sup>+</sup>	ND
		5 iones H <sup>+</sup>	1209,4	5 iones H <sup>+</sup>	1210,0
		6 iones H <sup>+</sup>	1008,0	6 iones H <sup>+</sup>	1008,6
		7 iones H <sup>+</sup>	864,1	7 iones H <sup>+</sup>	864,6
		8 iones H <sup>+</sup>	756,2	8 iones H <sup>+</sup>	756,6
TPV44	6123	4 iones H <sup>+</sup>	1531,8	4 iones H <sup>+</sup>	1532,5
		5 iones H <sup>+</sup>	1225,6	5 iones H <sup>+</sup>	1226,3
		6 iones H <sup>+</sup>	1021,5	6 iones H <sup>+</sup>	1022,1
		7 iones H <sup>+</sup>	875,7	7 iones H <sup>+</sup>	876,2
		8 iones H <sup>+</sup>	766,4	8 iones H <sup>+</sup>	768,8

(continuación)

TPV45	6279,2	4 iones H <sup>+</sup>	1570,8	4 iones H <sup>+</sup>	1571,5
		5 iones H <sup>+</sup>	1256,8	5 iones H <sup>+</sup>	1257,5
		6 iones H <sup>+</sup>	1047,5	6 iones H <sup>+</sup>	1048,1
		7 iones H <sup>+</sup>	898,0	7 iones H <sup>+</sup>	898,5
		8 iones H <sup>+</sup>	785,9	8 iones H <sup>+</sup>	786,3
"ND" indica "no detectado"					

5

La Tabla 2 muestra las secuencias de aminoácidos de los péptidos de epítipo CTL sintetizados, y las Tablas 3 y 4 muestran las secuencias de aminoácidos de los péptidos que tienen 4 epítipos unidos. Los péptidos que tienen 4 epítipos unidos mostrados en la Tabla 4 se preparan cada uno de ellos, en TPV12, TPV06 y TPV26 mostrados en las Tablas 3, añadiendo al extremo N una secuencia peptídica que consiste en restos de arginina y utilizando un trímero de arginina como engarce entre péptidos.

WT1 (SEQ ID NO: 20) se sintetizó como un péptido de control que se une a HLA-A2 y Her2 (SEQ ID NO: 21) se sintetizó como un péptido de control que se une a HLA-A24.

Tabla 2

Péptidos de epítipo CTL			
Péptido	Origen	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
PEP1	Lck-246	KLVERLGAA	SEQ ID NO: 1
PEP2	WHSC2-103	ASLSDPWV	SEQ ID NO: 2
PEP4	SART3-302	LLQAEAPRL	SEQ ID NO: 4
PEP5	SART2-93	DYSARWNEI	SEQ ID NO: 5
PEP6	SART3-109	VYDYNCHVDL	SEQ ID NO: 6
PEP7	MRP3-503	LYAWEPSFL	SEQ ID NO: 7
PEP8	Lck-488	DYLRSVLEDF	SEQ ID NO: 8
PEP9	SART3-734	QIRPIFSNR	SEQ ID NO: 9
PEP10	Lck-90	ILEQSGEWWK	SEQ ID NO: 10
PEP13	UBE2V-43	RLQEWCSVI	SEQ ID NO: 13
PEP15	EGFR-800	DYVREHKDNI	SEQ ID NO: 15
PEP17	MRP3-1293	NYSVRYRPGI	SEQ ID NO: 17
PEP18	PTH-102	RYLTQETNKV	SEQ ID NO: 18
WT1	WT1-126	RMFPNAPYL	SEQ ID NO: 20
Her2	Her2-63	TYLPTNASL	SEQ ID NO: 21

Tabla 3

Péptidos que tienen 4 epítipos unidos		
Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
TPV01	PEP5-RR-PEP6-RR-PEP9-RR-PEP4	SEQ ID NO: 22
TPV02	PEP9-RR-PEP5-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 23
TPV03	PEP6-RR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP4	SEQ ID NO: 24

ES 2 796 301 T3

(continuación)

Péptidos que tienen 4 epítomos unidos		
Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
TPV04	PEP6-RR-PEP9-RR-PEP5-RR-PEP4	SEQ ID NO: 25
TPV05	PEP9-RR-PEP6-RR-PEP5-RR-PEP4	SEQ ID NO: 26
TPV06	PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 27
TPV07	PEP1-RR-PEP7-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 28
TPV08	PEP1-RR-PEP8-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 29
TPV09	PEP7-RR-PEP1-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 30
TPV10	PEP8-RR-PEP7-RR-PEP1-RR-PEP2	SEQ ID NO: 31
TPV11	PEP8-RR-PEP1-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 32
TPV12	PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 33
TPV13	PEP8-RR-PEP13-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 34
TPV14	PEP 13-RR-PEP7-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 35
TPV15	PEP8-RR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP2	SEQ ID NO: 36
TPV16	PEP 13-RR-PEP8-RR-PEP7-RR-PEP2	SEQ ID NO: 37
TPV17	PEP13-RR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 38
TPV18	PEP13-RR-PEP18-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 39
TPV19	PEP15-RR-PEP13-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 40
TPV20	PEP15-RR-PEP18-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 41
TPV21	PEP18-RR-PEP13-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 42
TPV22	PEP18-RR-PEP15-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 43
TPV23	PEP1-RR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 44
TPV24	PEP1-RR-PEP18-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 45
TPV25	PEP15-RR-PEP1-RR-PEP18-RR-PEP10	SEQ ID NO: 46
TPV26	PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 47
TPV27	PEP18-RR-PEP1-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 48
TPV28	PEP18-RR-PEP15-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 49
TPV29	PEP15-RR-PEP17-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 50
TPV30	PEP15-RR-PEP13-RR-PEP17-RR-PEP10	SEQ ID NO: 51
TPV31	PEP17-RR-PEP15-RR-PEP13-RR-PEP10	SEQ ID NO: 52
TPV32	PEP17-RR-PEP13-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 53
TPV33	PEP13-RR-PEP17-RR-PEP15-RR-PEP10	SEQ ID NO: 54
TPV34	PEP13-RR-PEP15-RR-PEP17-RR-PEP10	SEQ ID NO: 55
TPV35	PEP6-RR-PEP18-RR-PEP5-RR-PEP9	SEQ ID NO: 56
TPV36	PEP6-RR-PEP5-RR-PEP18-RR-PEP9	SEQ ID NO: 57
TPV37	PEP1-RR-PEP7-RR-PEP6-RR-PEP5	SEQ ID NO: 58
TPV38	PEP7-RR-PEP1-RR-PEP6-RR-PEP5	SEQ ID NO: 59
"- RR-" representa un dímero de arginina.		

Tabla 4

Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
TPV39	RRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 60
TPV40	RRRR-PEP7-RR-PEP13-RR-PEP8-RR-PEP2	SEQ ID NO: 61
TPV41	PEP7-RRR-PEP13-RRR-PEP8-RRR-PEP2	SEQ ID NO: 62
TPV42	RRR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 63
TPV43	RRRR-PEP5-RR-PEP9-RR-PEP6-RR-PEP4	SEQ ID NO: 64
TPV44	RRR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 65
TPV45	RRRR-PEP15-RR-PEP18-RR-PEP1-RR-PEP10	SEQ ID NO: 66
"- RR-" representa un dímero de arginina. "-RRR-" representa un trímero de arginina.		

"RRR-" y "RRRR-" son secuencias peptídicas añadidas a los extremos N, que comprenden 3 restos de arginina y 4 restos de arginina, respectivamente.

#### 5 Ejemplo 2: Inducciones de CTL específicos de péptido de epítipo en modelo de ratón y detección de los CTL utilizando ELISPOT

Los péptidos que tienen 4 epítipos unidos se disolvieron en agua destilada (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) a 2 mg/ml o 4 mg/ml, y la solución resultante se introdujo en la jeringa B Braun Injekt. Después de introducir una cantidad equivalente de adyuvante incompleto de Freund (AIF) en otra jeringa, estas jeringas se conectaron entre sí utilizando un conector de jeringa GP, y una solución de los péptidos que tienen 4 epítipos unidos se mezcló exhaustivamente con AIF para preparar una emulsión. La emulsión se administró semanalmente en cantidades de 100 µl cada vez, cerca de la base de la cola de ratones (ratones transgénicos HLA-A2.1 y transgénicos HLA-A24 (Taconic)), y las administraciones se llevaron a cabo dos veces en total. Se recogieron los ganglios linfáticos inguinales de los ratones 1 semana después de la administración final. Se ajustó una suspensión de células de ganglios linfáticos a  $5 \times 10^6$  células/ml utilizando medio completo (RPMI-1640, SFB al 10 % inactivado por calor, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y 2-mercaptoetanol 50 µM), se añadieron el péptido de epítipo CTL diana (concentración final: 10 µg/ml), IL-15 recombinante de ratón (concentración final: 100 ng/ml) e IL-21 recombinante de ratón (concentración final: 100 ng/ml), estas células se sembraron en una placa de 24 pocillos a 1 ml/pocillo y se cultivaron en una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 8 días. Después de eso, las células se recogieron y sembraron en una placa con anticuerpo anti-IFN-γ inmovilizado incluida en el kit Murine IFN-γ ELISpot (GEN-PROBE), a  $1 \times 10^5$  células/pocillos. Posteriormente, los esplenocitos obtenidos del bazo del ratón singénico e irradiados con rayos X a 30 Gy se colocaron en la misma placa a  $1 \times 10^5$  células/pocillo como células presentadoras de antígeno, se añadió el péptido de epítipo CTL diana o el péptido de control negativo (concentración final: 10 µg/ml) y se incubó en una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante una noche. Al día siguiente, las manchas que indican la existencia de células productoras de IFN-γ se colorearon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El número de manchas de células productoras de IFN-γ se cuantificó utilizando un analizador ELISPOT (Immunospot S6, Cellular Technology Ltd.). La inducción de CTL específicos para péptidos de epítipo CTL se evaluó como positiva cuando el número de manchas de células productoras de IFN-γ en los pocillos complementados con los péptidos de epítipo CTL diana fue significativamente mayor que la observada en los pocillos complementados con los péptidos de control negativo (prueba de t de Student,  $p < 0,05$ ). Como péptido de control negativo se utilizó WT1 o Her2. Para visualizar el nivel de inducción de CTL, los resultados de la siguiente ecuación se designaron como "Δ" (el número promedio de manchas de células productoras de IFN-γ en los pocillos complementados con los péptidos de epítipo CTL diana) - (el número promedio de manchas de células productoras de IFN-γ en los pocillos complementados con los péptidos de control negativo). Los resultados se representan como positivos en el caso de  $10 \leq \Delta < 100$ ; medio positivos en el caso de  $100 \leq \Delta < 200$ ; y fuertemente positivos en el caso de  $200 \leq \Delta$ .

35 Las Figs. 3-1 a 3-4 muestran los resultados de la evaluación de la inducción de CTL específicos para péptidos de epítipo CTL. Cuando el péptido que tiene 4 epítipos unidos tiene una o más características seleccionadas entre las siguientes características <1> a <3>, como se muestra en las Fig. 3-1 a 3-4, se indujeron al menos 3 tipos de CTL de los 4 tipos de péptidos de epítipo CTL unidos.

- 40 <1> El péptido comprende PEP4 en el extremo C.  
 <2> El péptido comprende PEP6 y PEP5 en el extremo C dispuestos sucesivamente en tal orden desde el extremo N a través de un engarce.  
 <3> El péptido comprende PEP5, PEP6, PEP9 y PEP18.

Cuando se añadió adicionalmente una secuencia peptídica que consiste en restos de arginina al extremo N o cuando un engarce péptido-péptido era un trímero de arginina, como se muestra en la Fig. 3-4, los CTL se indujeron

satisfactoriamente como se describe anteriormente.

En el caso de péptidos que tienen 4 epítomos unidos que tienen el orden de unión mostrado en CPV01 a CPV16, sin embargo, la inducción de CTL no se observó en tres o más péptidos, como se muestra en las Fig. 3-1 a 3-3.

5 En concreto, incluso si los péptidos que tienen 4 epítomos CTL unidos se componen de 4 tipos de péptidos de epítomo seleccionados de 13 tipos particulares de péptidos de epítomo (PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18) (es decir, CPV14, CPV15 y CPV16), la inducción de CTL no se observó en tres o más péptidos en los péptidos que tiene 4 epítomos CTL unidos.

### **Ejemplo 3: Predicción de la posición de escisión peptídica con inmunoproteasomas 20S humanos (i20S)**

10 Las muestras de escisión de péptidos que tienen 4 epítomos unidos se prepararon de la manera descrita a continuación. En concreto, los péptidos que tienen 4 epítomos unidos se diluyeron a 66,7 µg/ml con un tampón de reacción (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,8, MgAc<sub>2</sub> 2 mM, ditiotreitól 2 mM), y el resultante se distribuyó en tubos de reacción, en cantidades de 300 µl por tubo. Se añadieron inmunoproteasomas 20S humanos (R&D systems) a los mismos, en cantidades de 2 µg por tubo, las mezclas se agitaron y los resultantes se sometieron a continuación a incubación con agitación a 37 °C durante 1, 2 o 4 horas. Después de eso, se añadió ácido acético en cantidades de 15 30 µl por tubo, para finalizar las reacciones enzimáticas, y las muestras se liofilizaron inmediatamente en un congelador a -80 °C.

20 Posteriormente, las muestras de escisión obtenidas de los péptidos que tienen 4 epítomos unidos se aplicaron a los sistemas de LC/MS-MS (sistema Acquity UPLC, Waters; Synapt G2 HDMS, Waters), para realizar un análisis exhaustivo de los pesos moleculares de los fragmentos peptídicos. Con el uso de un programa informático analítico (MassLynx, ver. 4.1, SCN712, Waters), se analizaron las muestras y se identificaron los fragmentos peptídicos. Se evaluó que los péptidos que tienen 4 epítomos unidos eran escindibles al desarrollar cualquiera de los péptidos en los que se escinde el péptido de epítomo, un péptido que comprende restos de arginina añadidos al extremo N del péptido de epítomo o un péptido que comprende un dímero de arginina añadido al extremo N del péptido de epítomo, como resultado de la escisión con inmunoproteasomas.

25 Los resultados del análisis realizado con el uso de los inmunoproteasomas mostrados en las Fig. 3-1 a 3-4 demuestran que se precisa que dos tipos de péptidos de epítomo CTL, PEP2 y PEP10, estén ubicados en las posiciones más cercanas al extremo C del péptido que tiene 4 epítomos unidos, para determinar los aminoácidos C terminales de los péptidos de epítomo CTL de interés. Por consiguiente, es preferible que PEP2 o PEP10 estén unidos al extremo C del péptido que tiene 4 epítomos unidos.

### **30 Ejemplo 4: Preparación de perlas con péptidos de epítomo CTL inmovilizados**

35 Los péptidos se inmovilizaron en microesferas xMAP Multi-Analyte COOH (Luminex Corporation; en lo sucesivo en el presente documento denominado "perlas") de la manera descrita a continuación. Las perlas se lavaron con tampón MES (MES-NaOH 0,1 M; pH 7,0) y el sobrenadante se eliminó después por centrifugación. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces y las perlas se suspendieron en 75 µl de un tampón MES. Se añadió una solución de péptido de epítomo CTL (100 µl, 1 mg/ml) y 5 µl de EDC (clorhidrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)carbodiimida) 10 mg/ml a la suspensión de perlas, seguido de una mezcla exhaustiva. Después de eso, se realizó la reacción a 30 °C en oscuridad durante una noche. Después de la eliminación del sobrenadante por centrifugación al día siguiente, se añadieron 125 µl de Tris-HCl 1 M y se llevó la incubación a 30 °C en oscuridad durante 30 minutos. Después de que el sobrenadante se eliminara nuevamente, las perlas se lavaron dos veces con un tampón de lavado (PBS (-), Tween 20 al 0,05 %), y se suspendieron en Immunoblock (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Así, se finalizó la inmovilización del péptido de epítomo CTL.

### **Ejemplo 5: Medición del título de anticuerpos IgG específicos para epítomos CTL**

45 Los péptidos que tienen 4 epítomos unidos de acuerdo con la presente invención se disolvieron en agua destilada (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) a 2 mg/ml, y la solución resultante se introdujo en una jeringa B Braun Injekt. Después de introducir una cantidad equivalente de AIF en otra jeringa, estas jeringas se conectaron entre sí utilizando un conector de jeringa GP y una solución de los péptidos que tienen 4 epítomos unidos se mezcló exhaustivamente con AIF para preparar una emulsión. La emulsión se administró semanalmente en cantidades de 100 µl cada una cerca de la base de la cola de ratones CBF1 (C57BL/6xBalb/c F1) y en total la administración se llevó a cabo tres veces. Se recogió sangre de los ratones una semana después de la administración final para obtener muestras de suero. Como muestras de control, se prepararon emulsiones utilizando mezclas de 4 tipos de péptidos seleccionados entre PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15 y PEP18 (1 mg/ml cada uno), y las emulsiones resultantes se administraron en conformidad con la misma pauta que con el péptido que tiene 4 epítomos unidos (grupo al que se administró la mezcla).

55 Las perlas con péptido de epítomo CTL inmovilizado diluidas con Immunoblock se distribuyeron en pocillos de una placa de filtro de 96 pocillos. Las cuentas distribuidas se lavaron con un tampón de lavado y, posteriormente, se añadieron en cada pocillo 100 µl de las muestras de suero de ratón diluidas 200 veces con Immunoblock. La placa se incubó durante 90 minutos a 30 °C con un mezclador a 600 rpm. Después de lavar tres veces la placa con un tampón

de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de IgG (H+L) anti-ratón biotinilada (Vector Laboratories) diluida 500 veces con Immunoblock y la placa se incubó durante 60 minutos a 30 °C con mezclado a 600 rpm. Después de lavar tres veces la placa con un tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de estreptavidina-R-ficoeritrina (Invitrogen) diluido 500 veces con Immunoblock y la placa se incubó durante 30 minutos a 30 °C con mezclado a 600 rpm. Después de lavar tres veces la placa con un tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un tampón de lavado para suspender las perlas y se midió la intensidad de fluorescencia media de la PE que se había unido específicamente a las perlas de interés, utilizando el sistema Bio-Plex Suspension Array System (BIO-RAD).

Los resultados de la medición del título de anticuerpos IgG específicos para epítopos CTL son como se muestra en las Fig. 4-1 a 4-3. Las Fig. 4-1 a 4-3 muestran el grado de producción de anticuerpos IgG específicos para epítopos CTL en comparación con el del grupo de control negativo (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como "grupo de AIF"). Los resultados obtenidos procedentes del grupo de AIF, al que se había administrado una emulsión preparada mezclando cantidades equivalentes de AIF y agua destilada (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.), se compararon con los resultados obtenidos en conformidad con la misma pauta de tratamiento que la de la mezcla de péptidos de epítipo CTL o el péptido que tiene 4 epítopos unidos.

Como se muestra en las Fig. 4-1 a 4-3, la inducción de la producción de anticuerpos IgG específicos para epítopos CTL fue débil y la frecuencia de la misma fue baja en el grupo al que se le administró la mezcla. Cuando se administró el péptido que tiene 4 epítopos unidos, por el contrario, se observó con frecuencia una fuerte inducción de la producción de anticuerpos IgG específicos para epítopos CTL. Además, se descubrió que la cantidad de producción de IgG era significativamente mayor (por ejemplo, mayor varias veces diez a varias veces cien, que la observada en el grupo de AIF), dependiendo del tipo de péptido que tiene 4 epítopos unidos.

Estos resultados demuestran que la administración del péptido que tiene 4 epítopos unidos puede activar más fuertemente la inmunidad antitumoral que la administración de una mezcla de los péptidos de epítipo CTL que constituyen el péptido que tiene 4 epítopos unidos.

Para un paciente con cáncer que se ha tratado con una vacuna peptídica para el cáncer, la inducción de la producción de IgG específicas para péptido de epítipo CTL y la inducción de CTL específicos para péptidos de epítipo son eficaces para la prolongación de la vida. Por consiguiente, los efectos de prolongación de la vida logrados por la presente invención son superiores a los logrados mediante el tratamiento del cáncer utilizando vacunas peptídicas que comprenden péptidos de epítipo CTL conocidos o mezclas de los mismos. Por lo tanto, el péptido que tiene 4 epítopos unidos de acuerdo con la presente invención puede utilizarse adecuadamente como agente terapéutico y/o preventivo para cánceres o enfermedades provocadas por los mismos, y vacunas peptídicas para el cáncer que pueden proporcionar resultados de tratamiento superiores en comparación con el tratamiento del cáncer utilizando vacunas peptídicas que comprenden péptidos de epítipo CTL conocidos o mezclas de los mismos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
- <120> Nuevo péptido que comprende cuatro péptidos de epítipo CTL conectados linealmente
- <130> PH-5981-PCT
- <150> JP 2013-218524
- <151> 21/10/2013
- 40 <150> JP 2014-155132
- <151> 30/07/2014
- <160> 66
- <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala**
- 1**
- 5**
- 50 <210> 2
- <211> 9

ES 2 796 301 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
1 5

5 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ala Leu Val Glu Phe Glu Asp Val Leu  
1 5

10 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 4

Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
1 5

20 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile  
1 5

25 <210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

30 <210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu  
1 5

35 <210> 8  
<211> 10  
<212> PRT

ES 2 796 301 T3

<213> *Homo sapiens*  
 <400> 8  
 Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe  
 1 5 10

5 <210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9  
 Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg  
 1 5

10 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10  
 Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 1 5 10

15 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 11  
 Val Ile Gln Asn Leu Glu Arg Gly Tyr Arg  
 1 5 10

20 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 12  
 Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val  
 1 5 10

25 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 13  
 Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile  
 1 5

30 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14

35 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14

ES 2 796 301 T3

Ile Leu Gly Glu Leu Arg Glu Lys Val  
1 5

5 <210> 15  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 15

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

10 <210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 16

His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu  
1 5

15 <210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 17

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

20 <210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 18

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

25 <210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 19

Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu  
1 5

35 <210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 20

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

ES 2 796 301 T3

<210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 21

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu  
 1 5

<210> 22  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 22

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Val Tyr Asp Tyr As  
 1 5 10 15

Cys His Val Asp Leu Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Ar  
 20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
 35 40

15 <210> 23  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 23

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg  
 1 5 10 15

Trp Asn Glu Ile Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu  
 20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
 35 40

25 <210> 24  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 24

ES 2 796 301 T3

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala  
1 5 10 15

Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg  
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
35 40

5 <210> 25  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 25

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Gln Ile Arg Pro  
1 5 10 15

Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile  
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
35 40

10 <210> 26  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> péptido sintético

<400> 26

Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn  
1 5 10 15

Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile  
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
35 40

20 <210> 27  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 27

ES 2 796 301 T3

Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile  
1 5 10 15

Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu  
20 25 30

Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
35 40

<210> 28  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 28

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu  
1 5 10 15

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe  
20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
35 40

<210> 29  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> péptido sintético

15

<400> 29

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser  
1 5 10 15

Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu  
20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
35 40

<210> 30  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 30

ES 2 796 301 T3

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg  
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe

20

25

30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
35 40

5

<210> 31  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 31

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp  
1 5 10 15

Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala  
20 25 30

10

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
35 40

<210> 32  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 32

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Lys Leu Val Glu  
1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu  
20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
35 40

20

<210> 33  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

25

<400> 33

ES 2 796 301 T3

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp  
 1 5 10 15

Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe  
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40

5 <210> 34  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 34

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Arg Leu Gln Glu  
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu  
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40

10 <210> 35  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> péptido sintético

<400> 35

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu  
 1 5 10 15

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe  
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40

20 <210> 36  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 36

ES 2 796 301 T3

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp  
 1 5 10 15

Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile  
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40

5 <210> 37  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 37

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser  
 1 5 10 15

Val Leu Glu Asp Phe Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu  
 20 25 30

Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40

10 <210> 38  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 38

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu  
 1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys  
 20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

20 <210> 39  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético  
 <400> 39

ES 2 796 301 T3

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln  
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn  
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

5 <210> 40  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 40  
 Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu  
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys  
 20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

10 <210> 41  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> péptido sintético

<400> 41

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr  
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val  
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

20 <210> 42  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 42

ES 2 796 301 T3

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Arg Leu Gln Glu  
1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn  
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
35 40 45

5 <210> 43  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 43

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg  
1 5 10 15

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val  
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
35 40 45

10 <210> 44  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> péptido sintético

<400> 44

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu  
1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys  
20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
35 40 45

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

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 45

ES 2 796 301 T3

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln  
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn  
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

5 <210> 46  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 46

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Lys Leu Val Glu  
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys  
 20 25 30

Val Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

10 <210> 47  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> péptido sintético

<400> 47

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr  
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala  
 20 25 30

Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys

35 40 45

20 <210> 48  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 48

ES 2 796 301 T3

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu  
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn  
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

<210> 49  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 49

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Val Arg  
 1 5 10 15

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala  
 20 25 30

Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

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

10

<220>  
 <223> péptido sintético

15

<400> 50

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val  
 1 5 10 15

Arg Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val  
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

<210> 51  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 51

ES 2 796 301 T3

Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu  
1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly  
20 25 30

Leu Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
35 40 45

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

5

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 52

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

Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val  
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
35 40 45

<210> 53  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> péptido sintético

15

<400> 53

Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Arg Leu Gln Glu  
1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn  
20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
35 40 45

<210> 54  
<211> 45  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 54

ES 2 796 301 T3

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val Arg  
 1 5 10 15

Tyr Arg Pro Gly Leu Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn  
 20 25 30

Ile Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

<210> 55  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 55

Arg Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu  
 1 5 10 15

His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Asn Tyr Ser Val Arg Tyr Arg Pro Gly  
 20 25 30

Leu Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

<210> 56  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> péptido sintético

15

<400> 56

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Arg Tyr Leu Thr  
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu  
 20 25 30

Ile Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg  
 35 40

<210> 57  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 57

ES 2 796 301 T3

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Arg Arg Asp Tyr Ser Ala  
1 5 10 15

Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys  
20 25 30

Val Arg Arg Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg  
35 40

5 <210> 58  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 58

Lys Leu Val Glu Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu  
1 5 10 15

Pro Ser Phe Leu Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu  
20 25 30

Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile  
35 40

10 <210> 59  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> péptido sintético

<400> 59

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg  
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu  
20 25 30

Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile  
35 40

20 <210> 60  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 60

ES 2 796 301 T3

Arg Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Leu  
 1 5 10 15

Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu  
 20 25 30

Glu Asp Phe Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40 45

<210> 61  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 61

Arg Arg Arg Arg Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

Leu Gln Glu Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val  
 20 25 30

Leu Glu Asp Phe Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40 45

<210> 62  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> péptido sintético

15

<400> 62

Leu Tyr Ala Trp Glu Pro Ser Phe Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Glu  
 1 5 10 15

Trp Cys Ser Val Ile Arg Arg Arg Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu  
 20 25 30

Asp Phe Arg Arg Arg Ala Ser Leu Asp Ser Asp Pro Trp Val  
 35 40 45

<210> 63  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 63

ES 2 796 301 T3

Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln Ile  
 1 5 10 15

Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His  
 20 25 30

Val Asp Leu Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
 35 40 45

5 <210> 64  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 64

Arg Arg Arg Arg Asp Tyr Ser Ala Arg Trp Asn Glu Ile Arg Arg Gln  
 1 5 10 15

Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Arg Arg Val Tyr Asp Tyr Asn Cys  
 20 25 30

His Val Asp Leu Arg Arg Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu  
 35 40 45

10 <210> 65  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> péptido sintético

<400> 65

Arg Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu Arg  
 20 25 30

Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp Lys  
 35 40 45

20 <210> 66  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 66

ES 2 796 301 T3

Arg Arg Arg Arg Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Arg Arg  
1 5 10 15

Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Arg Arg Lys Leu Val Glu  
20 25 30

Arg Leu Gly Ala Ala Arg Arg Ile Leu Glu Gln Ser Gly Glu Trp Trp  
35 40 45

Lys

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en 4 epítomos unidos, en el que los 4 péptidos de epítomo se seleccionan del grupo que consiste en los péptidos de epítomo CTL: el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (PEP1); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (PEP2); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (PEP4); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 5 (PEP5); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 (PEP6); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 7 (PEP7); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 8 (PEP8); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 9 (PEP9); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 10 (PEP10); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 13 (PEP13); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 15 (PEP15); el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 17 (PEP17); y el péptido como se muestra en la SEQ ID NO: 18 (PEP18), unidos a través de engarces, el péptido que consiste en 4 epítomos unidos opcionalmente comprende otras secuencias peptídicas que consisten en aminoácidos hidrófilos, y el péptido que consiste en 4 epítomos unidos tiene una o más características seleccionadas de las siguientes características (1) a (5):

(1) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL seleccionados entre PEP1, PEP7, PEP8 y PEP13, y en el que PEP2 está dispuesto en el extremo C del péptido, excepto el péptido que comprende PEP7 y PEP8 en el extremo N dispuestos sucesivamente en tal orden desde el extremo N a través de un engarce;

(2) el péptido comprende PEP4 en el extremo C;

(3) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL seleccionados entre PEP1, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18, y en el que PEP10 está dispuesto en el extremo C del péptido;

(4) el péptido comprende 2 péptidos de epítomo CTL, PEP1 y PEP7, y en el que PEP6 y PEP5 están dispuestos sucesivamente en el extremo C en tal orden desde el extremo N a través de un engarce; y

(5) el péptido comprende 3 péptidos de epítomo CTL, PEP5, PEP6 y PEP18, y en el que PEP9 está dispuesto en el extremo C del péptido.

2. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos 4 epítomos unidos se seleccionan de manera redundante del grupo que consiste en PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18.

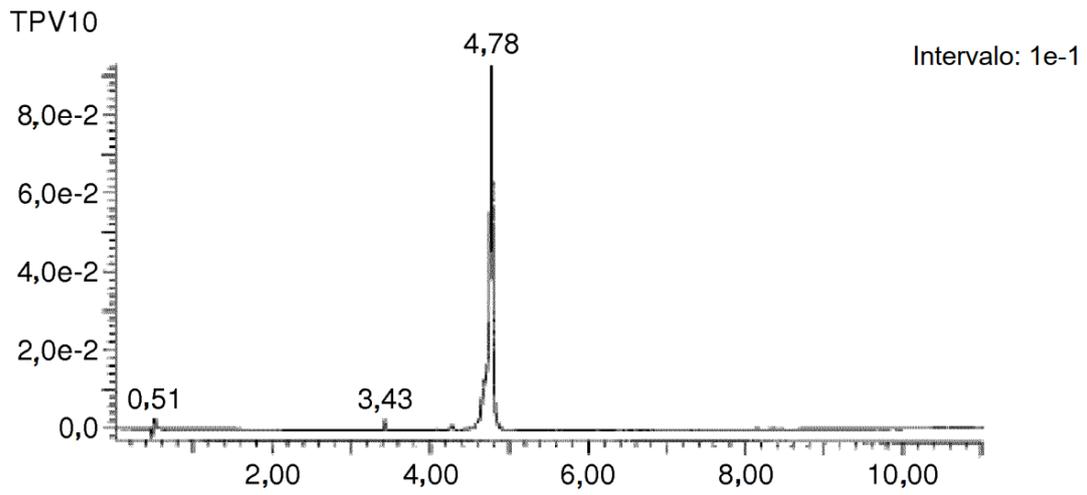
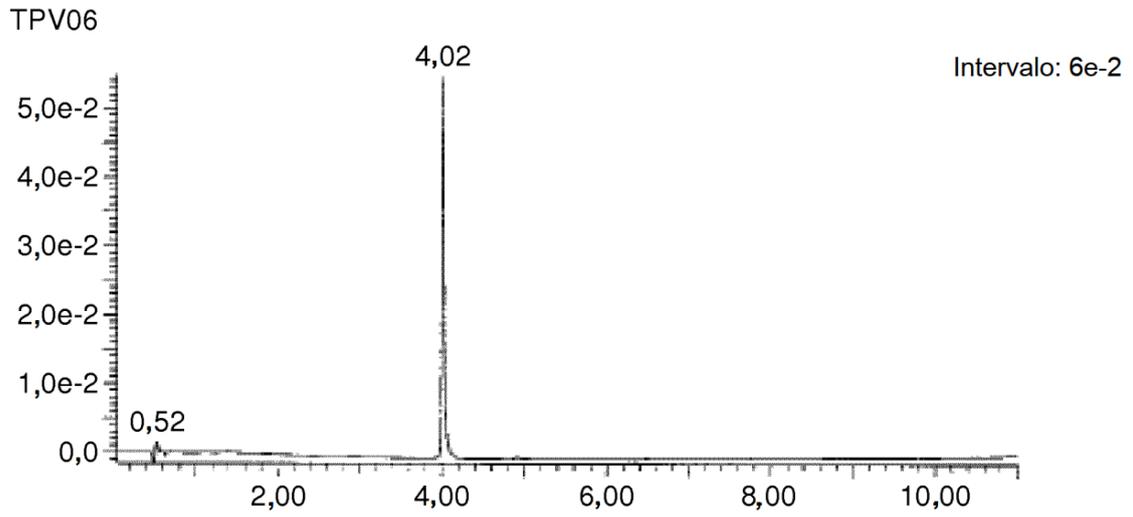
3. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende 4 péptidos no redundantes seleccionados entre PEP1, PEP2, PEP4, PEP5, PEP6, PEP7, PEP8, PEP9, PEP10, PEP13, PEP15, PEP17 y PEP18.

4. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, que comprende una secuencia seleccionada de las siguientes secuencias, en las que "-(L)-" representa un engarce:

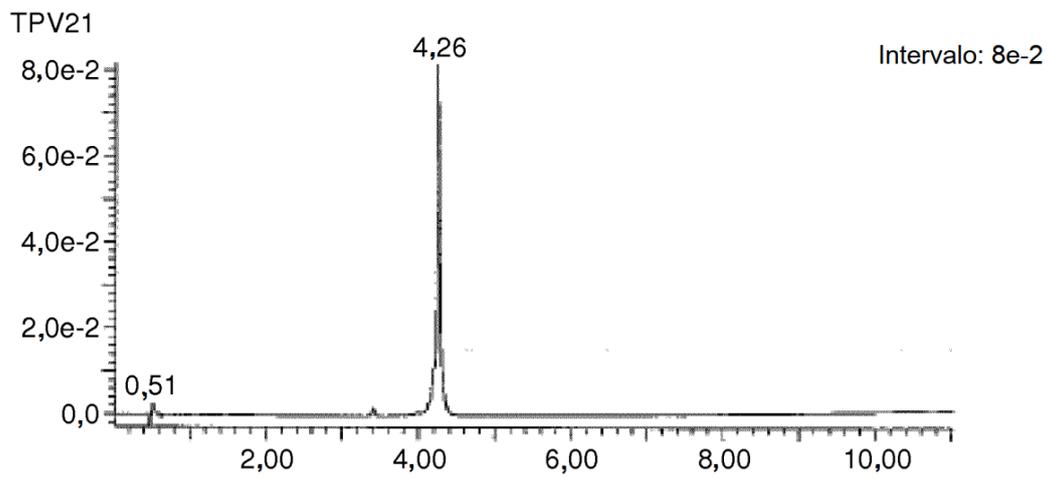
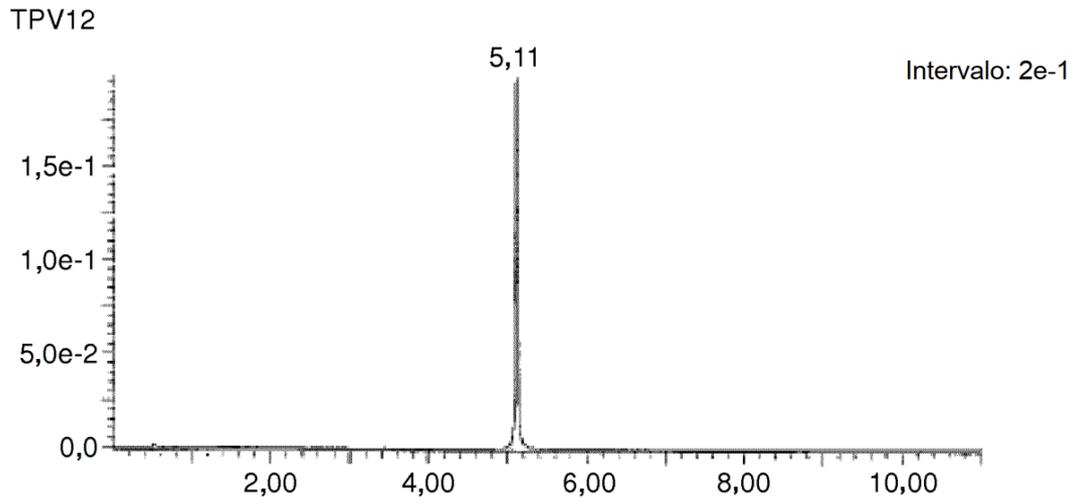
- PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP4;  
 - PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP6-(L)-PEP4;  
 - PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP4;  
 - PEP6-(L)-PEP9-(L)-PEP5-(L)-PEP4;  
 - PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP4;  
 - PEP5-(L)-PEP9-(L)-PEP6-(L)-PEP4;  
 - PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;  
 - PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;  
 - PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP8-(L)-PEP2;  
 - PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP2;  
 - PEP8-(L)-PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP2;  
 - PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP2;  
 - PEP8-(L)-PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP2;  
 - PEP13-(L)-PEP7-(L)-PEP8-(L)-PEP2;  
 - PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP13-(L)-PEP2;  
 - PEP13-(L)-PEP8-(L)-PEP7-(L)-PEP2;  
 - PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;  
 - PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;  
 - PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP18-(L)-PEP10;  
 - PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP10;  
 - PEP18-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10;  
 - PEP18-(L)-PEP 15-(L)-PEP13-(L)-PEP10;  
 - PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP10;  
 - PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP10;  
 - PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP18-(L)-PEP10;  
 - PEP15-(L)-PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP10;  
 - PEP18-(L)-PEP1-(L)-PEP15-(L)-PEP10;  
 - PEP18-(L)-PEP15-(L)-PEP1-(L)-PEP10;  
 - PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP10;  
 - PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP10;  
 - PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP13-(L)-PEP10;

- PEP17-(L)-PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
  - PEP13-(L)-PEP17-(L)-PEP15-(L)-PEP10;
  - PEP13-(L)-PEP15-(L)-PEP17-(L)-PEP10;
  - 5 - PEP6-(L)-PEP18-(L)-PEP5-(L)-PEP9;
  - PEP6-(L)-PEP5-(L)-PEP18-(L)-PEP9;
  - PEP1-(L)-PEP7-(L)-PEP6-(L)-PEP5; y
  - PEP7-(L)-PEP1-(L)-PEP6-(L)-PEP5.
5. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el engarce es un engarce aminoacídico.
- 10 6. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el engarce aminoacídico es un dímero de arginina o un trímero de arginina compuesto por dos o tres restos de arginina unidos entre sí.
- 15 7. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la otra secuencia peptídica que consiste en aminoácidos hidrófilos está unida al extremo N y en el que la otra secuencia peptídica que consiste en aminoácidos hidrófilos está compuesta por un trímero de arginina o un tetramero de arginina compuesto por tres o cuatro restos de arginina unidos entre sí.
- 20 8. El péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 66.
- 25 9. Una composición de CTL que comprende al menos 3 tipos de CTL obtenidos estimulando linfocitos de sangre periférica utilizando el péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que cada uno de los al menos 3 tipos de CTL es específico para un péptido de epítomo de CTL que constituye el péptido que consiste en 4 epítomos unidos.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de CTL de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende dos o más péptidos seleccionados entre los péptidos que consisten en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que es un agente inmunoterapéutico.
- 35 13. Un péptido para su uso en el tratamiento del cáncer, siendo dicho péptido el péptido que consiste en 4 epítomos unidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. Una composición de CTL de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento del cáncer.
15. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Fig. 1-1



**Fig. 1-2**



**Fig. 1-3**

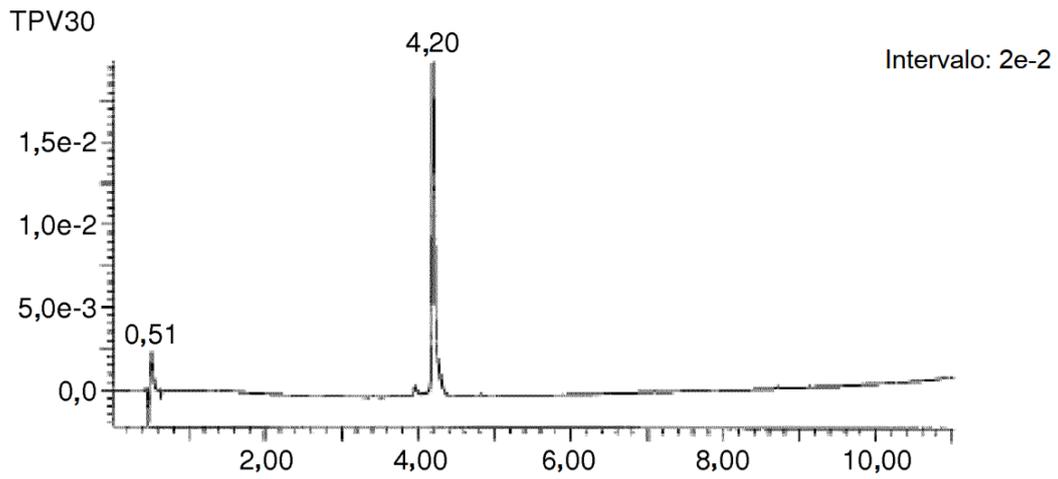
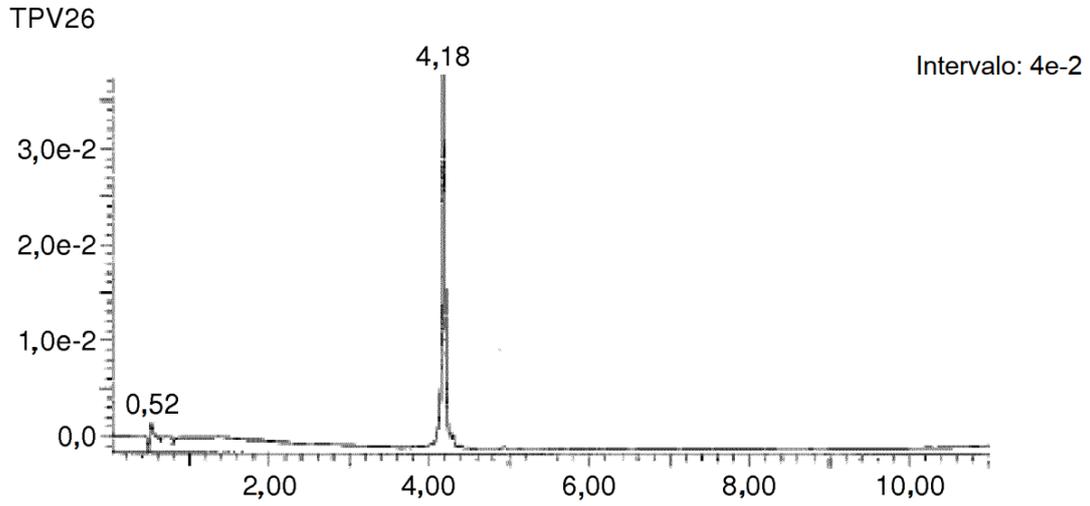


Fig. 1-4

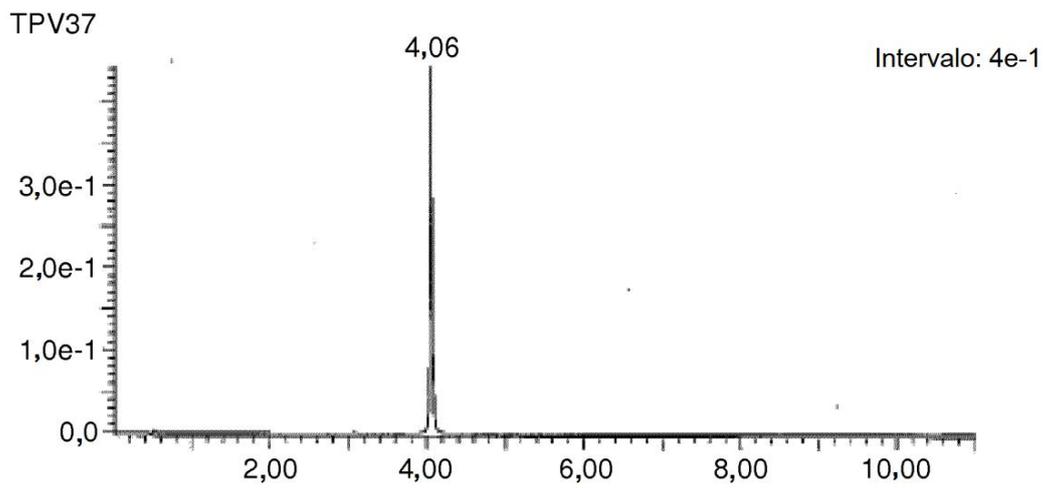
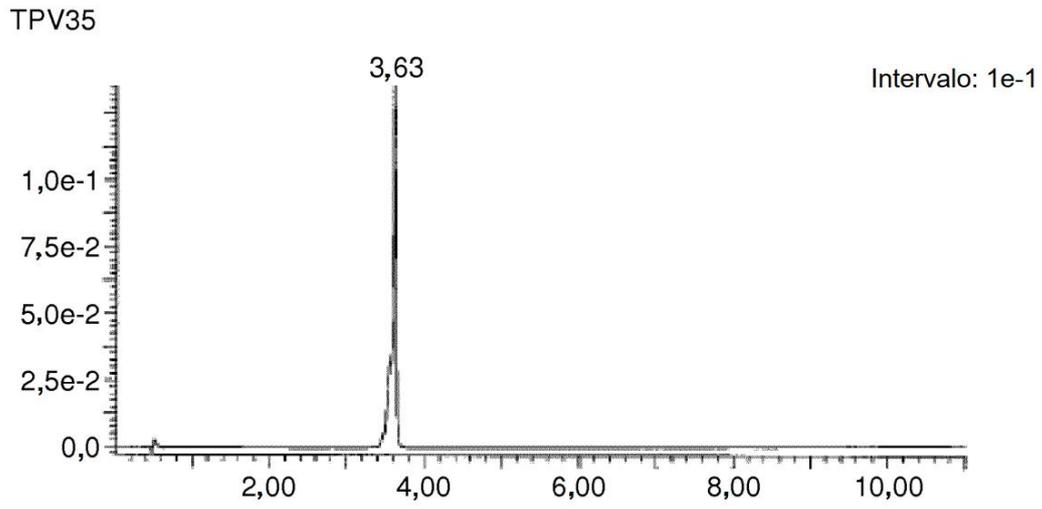


Fig. 1-5

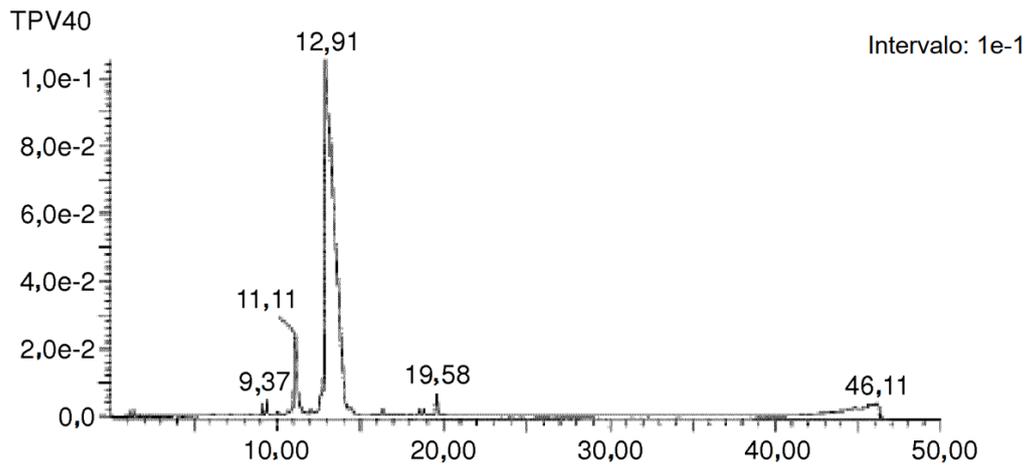
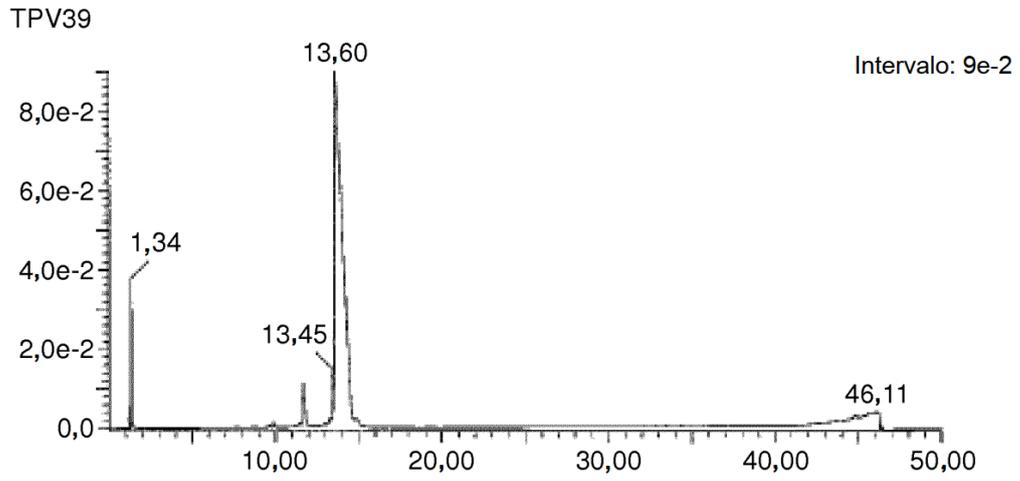
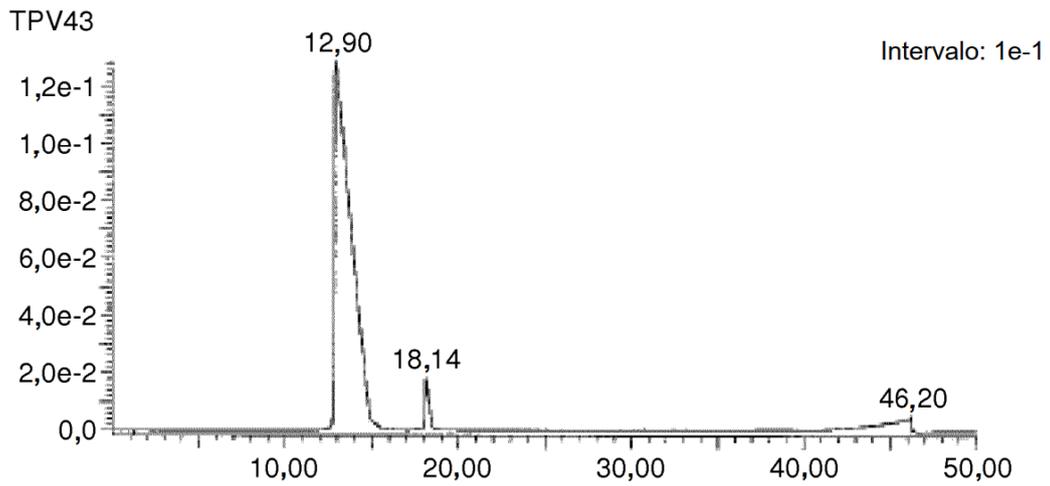
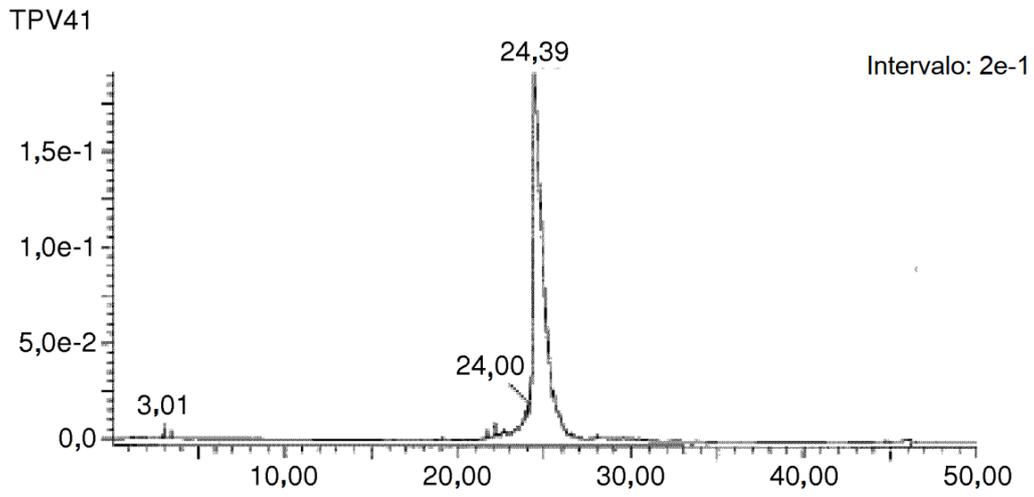


Fig. 1-6



**Fig. 1-7**

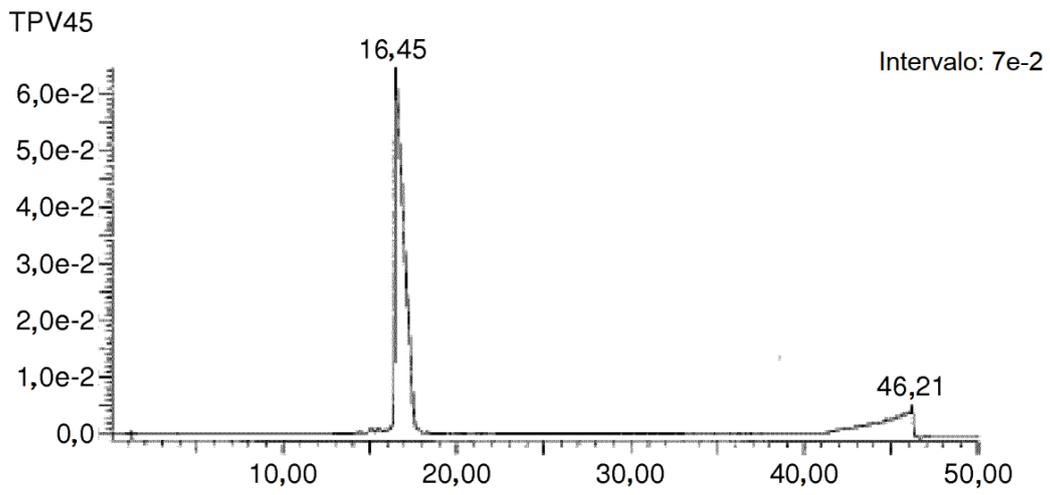


Fig. 2-1

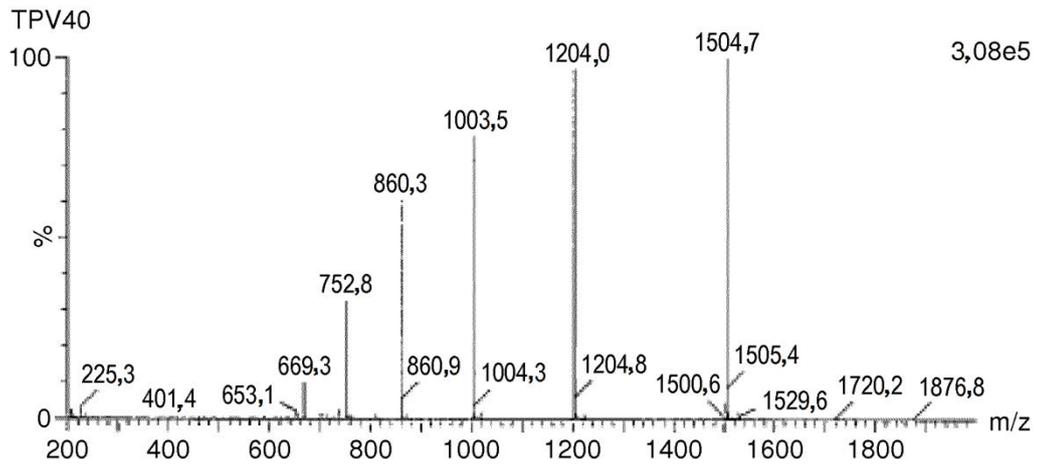
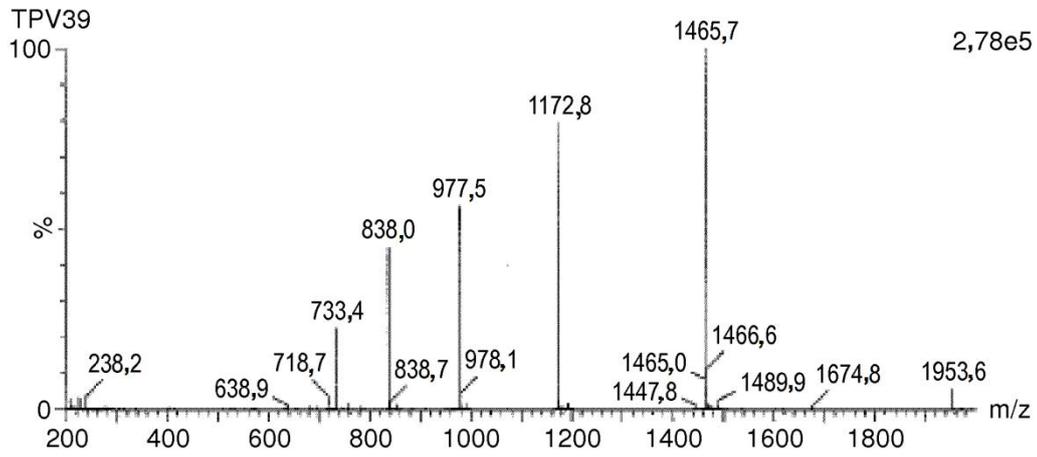
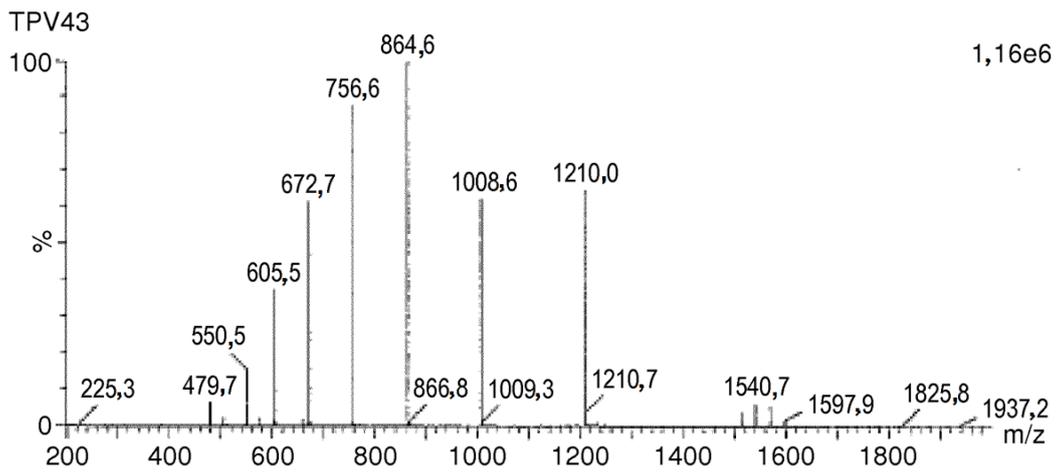
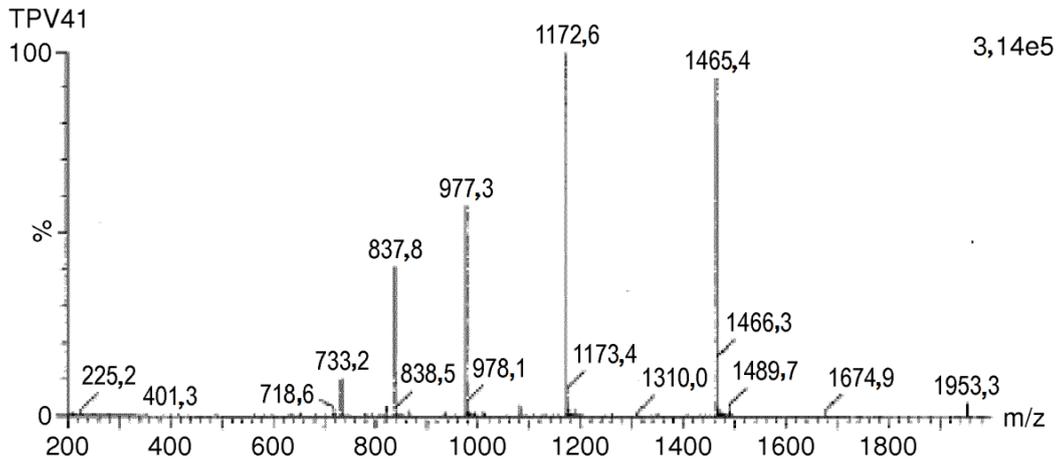
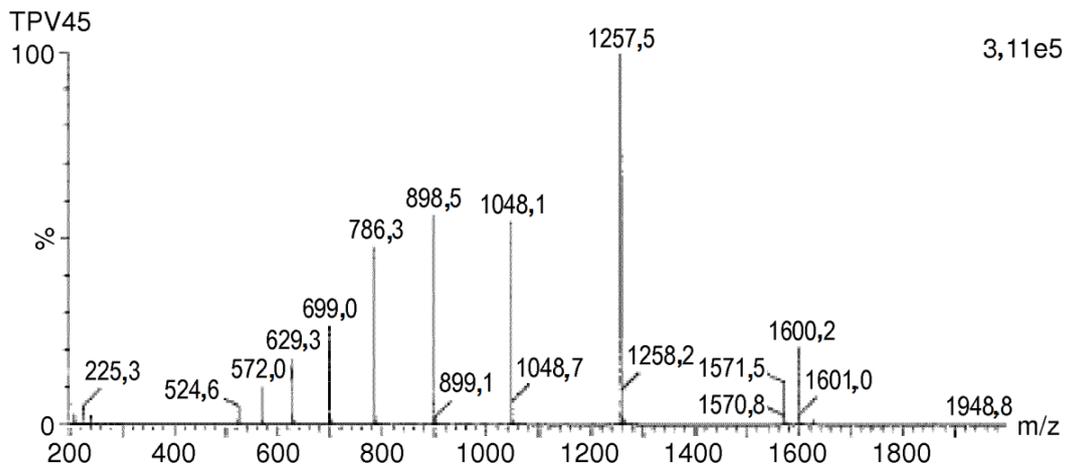


Fig. 2-2



**Fig. 2-3**



**Fig. 3-1**

Conjugado administrado	Inducción de CTL específicos para epítipo				PEP2 escindido con i20S	PEP10 escindido con i20S
	Extremo N		Extremo C			
TPV01	PEP5	PEP6	PEP9*	PEP4		
TPV02	PEP9*	PEP5	PEP6	PEP4		
TPV03	PEP6	PEP5	PEP9*	PEP4		
TPV04	PEP6	PEP9*	PEP5	PEP4		
TPV05	PEP9*	PEP6	PEP5	PEP4		
TPV06	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV07	PEP1	PEP7	PEP8*	PEP2*	○	
TPV08	PEP1	PEP8*	PEP7	PEP2*	○	
TPV09	PEP7	PEP1	PEP8*	PEP2*	○	
TPV10	PEP8*	PEP7	PEP1	PEP2*	○	
TPV11	PEP8*	PEP1	PEP7	PEP2*	○	
TPV12	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV13	PEP8*	PEP13	PEP7	PEP2*	○	
TPV14	PEP13	PEP7	PEP8*	PEP2*	○	
TPV15	PEP8*	PEP7	PEP13	PEP2*	○	
TPV16	PEP13	PEP8*	PEP7	PEP2*	○	
TPV17	PEP13	PEP15	PEP18	PEP10*		○
TPV18	PEP13	PEP18	PEP15	PEP10*		○
TPV19	PEP15	PEP13	PEP18	PEP10*		○

**Fig. 3-2**

Conjugado administrado	Inducción de CTL específicos para epítopo				PEP2 escindido con i20S	PEP10 escindido con i20S
	Extremo N			Extremo C		
TPV20	PEP15	PEP18	PEP13	PEP10*		○
TPV21	PEP18	PEP13	PEP15	PEP10*		○
TPV22	PEP18	PEP15	PEP13	PEP10*		○
TPV23	PEP1	PEP15	PEP18	PEP10*		○
TPV24	PEP1	PEP18	PEP15	PEP10*		○
TPV25	PEP15	PEP1	PEP18	PEP10*		○
TPV26	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10*		○
TPV27	PEP18	PEP1	PEP15	PEP10*		○
TPV28	PEP18	PEP15	PEP1	PEP10*		○
TPV29	PEP15	PEP17	PEP13	PEP10*		*
TPV30	PEP15	PEP13	PEP17	PEP10*		*
TPV31	PEP17	PEP15	PEP13	PEP10*		*
TPV32	PEP17	PEP13	PEP15	PEP10*		*
TPV33	PEP13	PEP17	PEP15	PEP10*		*
TPV34	PEP13	PEP15	PEP17	PEP10*		*
TPV37	PEP1	PEP7	PEP6	PEP5		
TPV38	PEP7	PEP1	PEP6	PEP5		
TPV35	PEP6	PEP18	PEP5	PEP9*		
TPV36	PEP6	PEP5	PEP18	PEP9*		

**Fig. 3-3**

Conjugado administrado	Inducción de CTL específicos para epítipo				PEP2 escindido con i20S	PEP10 escindido con i20S
	Extremo N		Extremo C			
CPV01	PEP18	PEP17	PEP14	PEP12*		
CPV02	PEP11*	PEP15	PEP19	PEP16		
CPV03	PEP11*	PEP16	PEP15	PEP19		
CPV04	PEP11*	PEP19	PEP15	PEP16		
CPV05	PEP15	PEP11*	PEP16	PEP19		
CPV06	PEP14	PEP12*	PEP13	PEP17		
CPV07	PEP17	PEP14	PEP13	PEP12*		
CPV08	PEP17	PEP13	PEP18	PEP14		
CPV09	PEP13	PEP12*	PEP14	PEP18		
CPV10	PEP17	PEP12*	PEP14	PEP18		
CPV11	PEP17	PEP13	PEP12*	PEP14		
CPV12	PEP17	PEP18	PEP14	PEP12*		
CPV13	PEP17	PEP18	PEP14	PEP13		
CPV14	PEP7	PEP8*	PEP1	PEP2*	○	
CPV15	PEP7	PEP8*	PEP13	PEP2*	*	
CPV16	PEP2*	PEP9*	PEP4	PEP5	*	

p>0,05	
p<0,05, 10 ≤ Δ < 100	
p<0,05, 100 ≤ Δ < 200	
p<0,05, 200 ≤ Δ	

No escindible	
Escindible	○
No examinado	*

**Fig. 3-4**

Conjugado administrado	Inducción de CTL específicos para epítipo				PEP2 escindido con i20S	PEP10 escindido con i20S
	Extremo N		Extremo C			
TPV39	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV40	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*	○	
TPV41	PEP7	PEP13	PEP8*	PEP2*		
TPV42	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV43	PEP5	PEP9*	PEP6	PEP4		
TPV44	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10*		
TPV45	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10*		

$p > 0,05$	
$p < 0,05, 10 \leq \Delta < 100$	
$p < 0,05, 100 \leq \Delta < 200$	
$p < 0,05, 200 \leq \Delta$	

No escindible	
Escindible	○
No examinado	*

**Fig. 4-1**

IgG específicas para epítipo (inducción en veces frente a AIF)				
mezcla 1	PEP10	PEP13	PEP15	PEP18
mezcla 2	PEP4	PEP5	PEP6	PEP9
mezcla 3	PEP1	PEP2	PEP7	PEP8
mezcla 4	PEP1	PEP10	PEP15	PEP18
Conjugado administrado	Extremo N		Extremo C	
TPV01	PEP5	PEP6	PEP9	PEP4
TPV02	PEP9	PEP5	PEP6	PEP4
TPV03	PEP6	PEP5	PEP9	PEP4
TPV04	PEP6	PEP9	PEP5	PEP4
TPV05	PEP9	PEP6	PEP5	PEP4
TPV06	PEP5	PEP9	PEP6	PEP4
TPV07	PEP1	PEP7	PEP8	PEP2
TPV08	PEP1	PEP8	PEP7	PEP2
TPV09	PEP7	PEP1	PEP8	PEP2
TPV10	PEP8	PEP7	PEP1	PEP2
TPV11	PEP8	PEP1	PEP7	PEP2
TPV12	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2
TPV13	PEP8	PEP13	PEP7	PEP2
TPV14	PEP13	PEP7	PEP8	PEP2
TPV15	PEP8	PEP7	PEP13	PEP2
TPV16	PEP13	PEP8	PEP7	PEP2
TPV17	PEP13	PEP15	PEP18	PEP10
TPV18	PEP13	PEP18	PEP15	PEP10
TPV19	PEP15	PEP13	PEP18	PEP10

**Fig. 4-2**

Conjugado administrado	Extremo N			Extremo C
	TPV20	PEP15	PEP18	PEP13
TPV21	PEP18	PEP13	PEP15	PEP10
TPV22	PEP18	PEP15	PEP13	PEP10
TPV23	PEP1	PEP15	PEP18	PEP10
TPV24	PEP1	PEP18	PEP15	PEP10
TPV25	PEP15	PEP1	PEP18	PEP10
TPV26	PEP15	PEP18	PEP1	PEP10
TPV27	PEP18	PEP1	PEP15	PEP10
TPV28	PEP18	PEP15	PEP1	PEP10
TPV29	PEP15	PEP17	PEP13	PEP10
TPV30	PEP15	PEP13	PEP17	PEP10
TPV31	PEP17	PEP15	PEP13	PEP10
TPV32	PEP17	PEP13	PEP15	PEP10
TPV33	PEP13	PEP17	PEP15	PEP10
TPV34	PEP13	PEP15	PEP17	PEP10
TPV37	PEP1	PEP7	PEP6	PEP5
TPV38	PEP7	PEP1	PEP6	PEP5

veces<2	
2<veces<10	
10<veces<100	
100<veces	

**Fig. 4-3**

	IgG específicas para epítipo (inducción en veces frente a AIF)			
Conjugado administrado	Extremo N		Extremo C	
TPV39	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2
TPV40	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2
TPV41	PEP7	PEP13	PEP8	PEP2

veces < 2	
2 < veces < 10	
10 < veces < 100	
100 < veces	