

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 916 834**

(51) Int. Cl.:

**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2015 PCT/JP2015/077223**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16047797**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2015 E 15844271 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2022 EP 3199175**

---

(54) Título: **Composición farmacéutica para inyección**

(30) Prioridad:

**27.09.2014 JP 2014197667**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2022**

(73) Titular/es:

**SUMITOMO PHARMA CO., LTD. (100.0%)**  
6-8, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi  
Osaka 541-0045, JP

(72) Inventor/es:

**TANAKA, SATOSHI y  
NAKATANI, TOMOMI**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 916 834 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**

Composición farmacéutica para inyección

**Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia del cáncer y se refiere a una composición farmacéutica inyectable que comprende un péptido antigénico del cáncer obtenido a partir de la proteína WT1 que tiene una actividad inductora de linfocitos T citotóxicos.

**Antecedentes**

Generalmente, el péptido antigénico del cáncer obtenido a partir de la proteína WT1 es un péptido parcial obtenido a partir de la proteína WT1 humana que consiste en 449 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), y es específicamente un péptido que consiste en 8-12 aminoácidos o un dímero del mismo. Se presenta a un antígeno de la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), e incluye un péptido que es reconocido como antígeno por los linfocitos T citotóxicos (linfocitos T citotóxicos, denominados en lo sucesivo CTLs). El MHC en humanos se denomina antígeno leucocitario humano (HLA).

Entre los péptidos parciales obtenidos a partir de la proteína WT1, el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (SEQ ID NO: 3) (péptido WT1<sub>126-134</sub>) y el péptido modificado obtenido modificando el segundo aminoácido del extremo N-terminal del péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Cys-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 6) (péptido WT1<sub>235-243</sub>) desde metionina a tirosina (es decir, el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 5)), han sido descritos que son útiles como péptidos que se unen al HLA para inducir CTLs (véanse los documentos de patente 1-4). Sin embargo, no se conoce todavía un péptido modificado obtenido mediante la conjugación de esos dos péptidos a través de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína, y tampoco se conoce una composición de vacuna contra el cáncer óptima a partir del mismo.

Por otro lado, entre los péptidos parciales obtenidos a partir de la proteína WT1, el péptido parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Trp-Ala-Pro-Val-Leu-Asp-Phe-Ala-Pro-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 1) (péptido WT1<sub>34-51</sub>) por sí mismo, es útil como un péptido que se une al HLA para inducir CTLs, y además se ha descrito que el uso combinado con el péptido mencionado anteriormente proporciona efectos como péptido auxiliar (véase el documento de patente 5). Sin embargo, no se conoce una composición óptima de vacuna contra el cáncer que contenga ese péptido.

Dado que una composición óptima de vacuna contra el cáncer que contiene el péptido WT1<sub>126-134</sub> y/o el péptido WT1<sub>235-243</sub> modificado y el péptido WT1<sub>34-51</sub>, es útil como vacuna contra el cáncer, era presumible el desarrollo de una formulación que asegurara la estabilidad de esos péptidos.

**Lista de documentos**

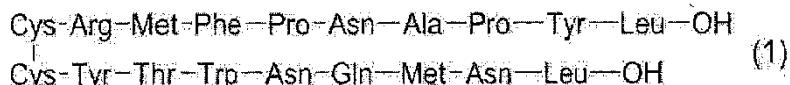
Documentos de patente

- documento de patente 1: WO 00/06602
- 35 documento de patente 2: WO 02/079253
- documento de patente 3: WO 2004/063217
- documento de patente 4: WO 2007/063903
- documento de patente 5: WO 2010/123065

**Compendio de la invención**

40 Problemas a resolver por la invención

Un problema de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica inyectable estable de un péptido representado por la fórmula (1) o un péptido parcial de WT1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Trp-Ala-Pro-Val-Leu-Asp-Phe-Ala-Pro-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 1), que puede usarse para formular una formulación de vacuna contra el cáncer que comprende el péptido:



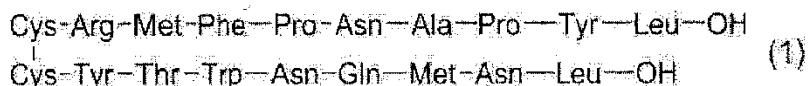
en donde el enlace entre Cys y Cys muestra un enlace disulfuro, Leu-OH muestra que el extremo C-terminal de Leu es un grupo carboxilo libre, y otro enlace es un enlace peptídico.

### Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han realizado estudios a fondo en un intento de resolver el problema mencionado anteriormente y han encontrado que una formulación líquida que contiene un péptido representado por la fórmula (1) y opcionalmente un péptido parcial de WT1 que tiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1, así como trehalosa y un ajustador de pH, proporcionan una formulación líquida y/o una formulación liofilizada que es superior en estabilidad de la formulación, lo que ha dado como resultado completar la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica inyectable que comprende los siguientes componentes:

(a) uno o más tipos de péptidos seleccionados a partir de un péptido representado por la fórmula (1):



10

en donde el enlace entre Cys y Cys es un enlace disulfuro, Leu-OH muestra que el extremo C-terminal de Leu es un grupo carboxilo libre, y otro enlace es un enlace peptídico, sus sales,

(b) trehalosa o hidrato de trehalosa, y

(c) un ajustador de pH.

### 15 Efecto de la invención

Usando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención, se puede producir una composición de vacuna contra el cáncer que contiene de manera estable el péptido de la presente invención que tiene una actividad inductora de linfocitos T citotóxicos, y se puede preparar una vacuna contra el cáncer que es superior en la estabilidad de la formulación. Además, cuando la composición farmacéutica inyectable se liofiliza para proporcionar una formulación liofilizada, se puede preparar una formulación liofilizada que conserva el péptido de forma estable.

### 20 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo experimental 4. El eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en el número de células sembradas, y el eje horizontal muestra el péptido sometido a pulsos *in vitro*. En la Fig. 1, la barra negra muestra los resultados del cultivo de esplenocitos obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*02:01, sometiendo a pulsos el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 3, y la barra blanca muestra los resultados del cultivo sin pulsos.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo experimental 4. El eje vertical muestra el número de células que reaccionaron en el número de células sembradas, y el eje horizontal muestra el péptido sometido a pulsos *in vitro*. En la Fig. 2, la barra negra muestra los resultados del cultivo de esplenocitos obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*24:02, sometiendo a pulsos el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 5, y la barra blanca muestra los resultados del cultivo sin pulsos.

### 25 Descripción de las realizaciones

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

30 En la presente invención, la "composición farmacéutica inyectable" se refiere a una composición que contiene el péptido de la presente invención y uno o más componentes distintos del péptido. Se puede preparar una composición de vacuna contra el cáncer mezclando una composición farmacéutica inyectable y varios adyuvantes.

La composición farmacéutica inyectable de la presente invención se puede proporcionar en forma de solución, suspensión, formulación liofilizada y formas similares.

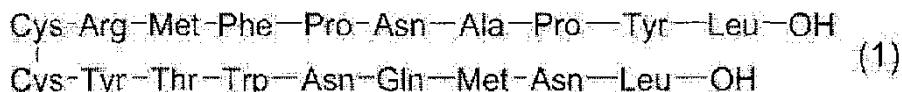
35 En la presente invención, la "formulación líquida" se refiere a los respectivos componentes contenidos en la "composición farmacéutica inyectable", que se disuelven en un disolvente. Aunque generalmente se usa agua como "disolvente" en la presente invención, un disolvente farmacológicamente aceptable tal como propilenglicol, polietilenglicol y similares puede mezclarse parcialmente con agua, siempre que el efecto de la invención no se vea afectado. Se prefiere el agua. Además, la "formulación liofilizada" mencionada a continuación añadida al agua y disuelta en ella, también se incluye en la "formulación líquida" de la presente invención.

40 En la presente invención, la "formulación en suspensión" se obtiene mezclando los respectivos componentes contenidos en la "composición farmacéutica inyectable" con un medio dispersante y suspendiéndolos en el mismo. Aunque generalmente se usa agua como "medio dispersante" en la presente invención, un disolvente farmacológicamente aceptable tal como propilenglicol, polietilenglicol y similares, se puede mezclar parcialmente con agua, siempre que el efecto de la invención no se vea afectado. Se prefiere el agua. Además, la "formulación liofilizada"

mencionada a continuación añadida al agua y suspendida en la misma, también se incluye en la "formulación en suspensión" de la presente invención.

En la presente invención, la "formulación liofilizada" se obtiene liofilizando la "formulación líquida" o la "formulación en suspensión" de la presente invención. Generalmente, se realiza para mejorar la estabilidad química o física del péptido en la "formulación líquida" o la "formulación en suspensión". Cuando se usa como una vacuna contra el cáncer, se añade una cantidad adecuada de agua y la mezcla se agita para proporcionar una formulación líquida o una formulación en suspensión, que se mezcla con varios adyuvantes para preparar una composición de vacuna contra el cáncer.

En la presente invención, el "péptido" es un péptido de un antígeno del cáncer para preparar una vacuna contra el cáncer, y es un péptido representado por la fórmula (1), o una sal del mismo.



en donde el enlace entre Cys y Cys es un enlace disulfuro, Leu-OH muestra que el extremo C-terminal de Leu es un grupo carboxilo libre, y otro enlace es un enlace peptídico.

En la presente memoria descriptiva, el péptido tiene el extremo N-terminal en el lado izquierdo, y cada símbolo de aminoácido indica el siguiente residuo de aminoácido.

15	Ala o A:	residuo de alanina
	Arg o R:	residuo de arginina
	Asn o N:	residuo de asparagina
	Asp o D:	residuo de ácido aspártico
	Cys o C:	residuo de cisteína
20	Gln o Q:	residuo de glutamina
	Glu o E:	residuo de ácido glutámico
	Gly o G:	residuo de glicina
	His o H:	residuo de histidina
	Ile o I:	residuo de isoleucina
25	Leu o L:	residuo de leucina
	Lys o K:	residuo de lisina
	Met o M:	residuo de metionina
	Phe o F:	residuo de fenilalanina
	Pro o P:	residuo de prolina
30	Ser o S:	residuo de serina
	Thr o T:	residuo de treonina
	Trp o W:	residuo de triptófano
	Tyr o Y:	residuo de tirosina
	Val o V:	residuo de valina
35	El "péptido representado por la fórmula (1)" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (SEQ ID NO: 4), en donde el residuo de cisteína está unido al extremo N-terminal de Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (SEQ ID NO: 3), y se une con el residuo de cisteína de un péptido mostrado por Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 5) mediante un enlace disulfuro.	
40	El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu (SEQ ID NO: 3) es un péptido parcial que consiste en 9 aminoácidos continuos desde la arginina 126 <sup>a</sup> (Arg) a la leucina 134 <sup>a</sup> (Leu) (péptido WT1 <sub>126-134</sub> ) desde el extremo N-terminal de una proteína (específicamente, proteína WT1 humana que consiste en 449 aminoácidos (SEQ ID NO: 2)), que es un producto génico de un gen supresor de tumores WT1 para	

el tumor de Wilms. Este péptido es un péptido presentado al antígeno del MHC de clase I y es reconocido como antígeno por los CTLs.

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO: 5) es un péptido modificado que es un péptido parcial que consiste en 9 aminoácidos continuos desde la cisteína 235<sup>a</sup> (Cys) a la leucina 243<sup>a</sup> (Leu) (péptido WT1<sub>235-243</sub>) desde el extremo N-terminal de la proteína WT1, en donde el segundo aminoácido del extremo N-terminal está modificado de metionina (Met) a tirosina (Tyr). Este péptido es un péptido presentado al antígeno del MHC de clase I y es reconocido como antígeno por los CTLs.

El "péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Trp-Ala-Pro-Val-Leu-Asp-Phe-Ala-Pro-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 1)" es un péptido parcial que consiste en 18 aminoácidos desde el triptófano 34<sup>º</sup> (Trp) hasta la leucina 51<sup>a</sup> (Leu) (péptido WT1<sub>34-51</sub>) desde el extremo N-terminal de la proteína WT1. Este péptido es un péptido presentado al antígeno del MHC de clase II e induce linfocitos T auxiliares específicos de WT1.

La sal del péptido representado por la fórmula (1) o el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1, no está particularmente limitada siempre que sea una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de la "sal" en la presente invención incluyen una sal de adición de ácido y una sal de adición de base. Ejemplos de la sal de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, yodhidrato, nitrato, fosfato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como citrato, oxalato, acetato, formato, propionato, benzoato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, metanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato y similares. Ejemplos de la sal de adición de base incluyen sales con base inorgánica tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de amonio y similares, sales con base orgánica tales como sal de trietilamonio, sal de trietanolamonio, sal de piridinio, sal de diisopropilamonio, etc. y similares, además, sales de aminoácidos a base de aminoácidos básicos o ácidos tales como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y similares.

El péptido de la presente invención también incluye hidratos, solvatos tales como solvato de etanol y similares de un péptido representado por la fórmula (1) o una sal del mismo. Además, el péptido de la presente invención incluye cualquier estereoisómero o una sal del mismo, tal como cualquier diastereómero, enantiómero y similares y cualquier cristal en cualquier realización, del péptido representado por la fórmula (1) que pueda estar presente.

El péptido representado por la fórmula (1) o una sal del mismo se puede producir mediante el método descrito en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva, o mediante un método conocido (véanse los documentos de patente 2-4, etc.). Por otro lado, el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 o una sal del mismo, puede producirse mediante un método conocido (véase el documento de patente 5). Además, el péptido de la presente invención se puede producir mediante un método generalmente utilizado en el campo técnico pertinente. Ejemplos del método de producción incluyen los métodos descritos en los documentos (*Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; peptide synthesis, Maruzen Co., LTD., 1975; Basics and Experiment of Peptide Synthesis, Maruzen Co., LTD., 1985; Development of Pharmaceutical Product subsequent vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten, 1991*) y similares.

Cuando el péptido de la presente invención obtenido mediante el método mencionado anteriormente, es una forma libre, la forma libre se puede convertir en una sal adecuada mediante un método conocido o un método análogo al mismo. Por el contrario, cuando el péptido de la presente invención se obtiene como una sal, la sal se puede convertir en una forma libre o en otra sal mediante un método conocido o un método análogo al mismo.

La composición farmacéutica inyectable de la presente invención puede contener un péptido representado por la fórmula (1) o un tipo de sal del mismo, cada uno por separado, o puede contener el péptido y uno o más tipos de sales del mismo, o dos o más tipos de sales del péptido (en lo sucesivo en el presente documento se denominará a veces de manera integral como "péptido (1)"). De manera similar, la composición farmacéutica inyectable de la presente invención puede contener adicionalmente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 o un tipo de sal del mismo, cada uno por separado, o puede contener el péptido y uno o más tipos de sales del mismo, o dos o más tipos de sales del péptido (en lo sucesivo en el presente documento se denominará a veces de manera integral como "péptido (2)"). Además, la composición farmacéutica inyectable de la presente invención contiene opcionalmente tanto el péptido (1) como el péptido (2).

Cuando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención es una formulación líquida o una formulación en suspensión (en lo sucesivo en el presente documento se denominará a veces "la formulación en forma líquida de la presente invención"), el contenido en péptido de la presente invención en relación con el peso de la formulación en una forma líquida de la presente invención, no está particularmente definido y solo necesita ser farmacológicamente aceptable o aceptable por sus propiedades. De los péptidos de la presente invención, por ejemplo, el contenido en péptido (1) (cuando están contenidos dos o más tipos de péptidos, la cantidad total de los mismos) es preferentemente de 0,5 mg - 200 mg/g, más preferentemente 0,5 mg - 100 mg/g, 0,5 mg - 50 mg/g o 1 mg - 25 mg/g, que se pueden seleccionar según el objeto. Por otro lado, el contenido en péptido (2) (cuando están contenidos dos o más tipos de péptidos, la cantidad total de los mismos) es preferiblemente de 0,05 mg - 200 mg/g, más preferiblemente 0,05 mg - 100 mg/g, 0,05 mg - 50 mg/g o 0,1 mg - 25 mg/g, que se pueden seleccionar según el objeto. Cuando la formulación líquida de la presente invención contiene tanto el péptido (1) como el péptido (2), la proporción en peso entre el péptido (1) y el péptido (2) puede seleccionarse apropiadamente a partir del intervalo 1:0,1 - 1:5.

- Cuando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención es una formulación liofilizada (en lo sucesivo en el presente documento se denominará a veces "la formulación liofilizada de la presente invención"), el contenido en péptido de la presente invención por volumen, no está particularmente definido. La formulación liofilizada de la presente invención se obtiene liofilizando la formulación en forma líquida de la presente invención, y el contenido en péptido solo tiene que satisfacer el contenido de la formulación en forma líquida. Una formulación en forma líquida de la presente invención, que tiene una concentración más alta que antes de la liofilización, puede obtenerse disolviendo o dispersando, en una cantidad menor de agua, etc., que la cantidad de líquido de la preparación en forma líquida de la formulación de la invención antes de la liofilización, durante la recuperación de agua de la formulación liofilizada de la presente invención.
- 5      La composición farmacéutica inyectable de la presente invención contiene característicamente, además del péptido de la presente invención mencionado anteriormente (componente (a)), los siguientes componentes (b) y (c):
- 10      (b) trehalosa o hidrato de trehalosa
  - 15      (c) un ajustador de pH.
- En la presente invención, "trehalosa" es un tipo de disacárido formado por el enlace 1,1-glicosídico de dos glucosas. La trehalosa puede ser un anhídrido o un hidrato de la misma. Se prefiere el hidrato de trehalosa. La composición farmacéutica inyectable de la presente invención puede contener trehalosa en una sola forma de anhídrido o hidrato de la misma, o dos o más tipos de las mismas pueden estar contenidos en combinación. En la composición farmacéutica inyectable de la presente invención, el contenido en trehalosa en relación con el peso de la composición no está particularmente definido. Su contenido en relación con el peso de la formulación en forma líquida de la presente invención (cuando está contenida en la forma que incluye dos o más tipos, su cantidad total) es, por ejemplo, de 1 - 50 mg/g, 1 - 70 mg/g, 1 - 100 mg/g, 1 - 150 mg/g, 1 - 200 mg/g, 3 - 50 mg/g, 3 - 70 mg/g, 3 - 100 mg/g, 3 - 150 mg /g, 3 - 200 mg/g, 5 - 50 mg/g, 5 - 70 mg/g, 5 - 100 mg/g, 5 - 150 mg/g, 5 - 200 mg/g o similar.
- 15      En la presente invención, el "ajustador de pH" es un ajustador de pH generalmente utilizado para la formulación farmacéutica. Ejemplos específicos del mismo incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, fosfato disódico, fosfato dibásico de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato tribásico de sodio y similares, o una de sus sales, ácidos orgánicos tales como ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido maleico, acetato de sodio hidratado, acetato de sodio anhídrico, citrato de sodio hidratado, dihidrógeno citrato de sodio, tartrato de sodio y similares, o una de sus sales, bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio , amoníaco acuoso y similares, y bases orgánicas tales como trometamol, histidina, L-arginina, meglumina y similares. Se prefieren ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, trimetamol, histidina, L-arginina y meglumina, y se prefieren más ácido tartárico, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, trometamol, L-arginina y meglumina.
- 20      Se añade un ajustador de pH para ajustar el pH de la formulación en forma líquida de la presente invención para que esté dentro de un intervalo de pH capaz de asegurar la estabilidad del péptido de la presente invención. Dado que el intervalo de pH capaz de asegurar la estabilidad del péptido de la presente invención varía dependiendo del tipo de péptido contenido en la formulación en forma líquida de la presente invención como se menciona a continuación, se utiliza un ajustador de pH adecuado para ello.
- 25      Cuando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención contiene solo el péptido (1), la formulación en forma líquida de la presente invención tiene un pH de 1-10. Cuando la formulación en forma líquida es una formulación líquida, el pH es preferiblemente 1-4, más preferiblemente 1-3, lo más preferiblemente 2-3, desde el punto de vista de la solubilidad y la estabilidad. Cuando la formulación en forma líquida es una formulación en suspensión, es preferible un pH de 5-10 de cara a la solubilidad. En una realización distinta a las mencionadas anteriormente, cuando la formulación en forma líquida es una formulación líquida, el pH preferible incluye 1,5-4,5, 1,5-3,5, 1,5-3,0, 2,0-3,0. Para una preparación en suspensión, el pH preferible incluye 4-9, 4-6, 5-9.
- 30      Además, cuando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención contiene el péptido (1) y el péptido (2), la formulación en forma líquida de la presente invención tiene un pH de 2-10. Cuando la formulación en forma líquida es una formulación líquida, un pH preferible incluye 2-4, 2-3, 1,7-3,2 y 1,5-3,5 desde el punto de vista de la estabilidad.
- 35      En la presente memoria descriptiva, los números se redondean a un dígito por debajo del número que se indica. Por ejemplo, cuando el número es 2, indica no menos de 1,5 y menos de 2,5.
- 40      Cuando la formulación en forma líquida de la presente invención no contiene un ajustador de pH y muestra un valor de pH más alto que el intervalo de pH deseado, el pH se puede ajustar al deseado agregando un ácido inorgánico, un ácido orgánico y similares como ajustador de pH. A modo de ácido inorgánico y ácido orgánico, se pueden usar los mencionados anteriormente.
- 45      Cuando la formulación en forma líquida de la presente invención no contiene un ajustador de pH y muestra un valor de pH más bajo que el intervalo de pH deseado, se puede usar una base inorgánica o una base orgánica como ajustador de pH. A modo de base inorgánica y base orgánica, se pueden utilizar las mencionadas anteriormente.

Específicamente, se pueden mencionar hidrógeno fosfato disódico, trometamol, histidina, L-arginina y meglumina y similares. Se prefieren hidrógeno fosfato disódico, trometamol, L-arginina y meglumina. En la composición farmacéutica inyectable de la presente invención, el contenido en base orgánica en relación con el peso de la composición no está particularmente definido. Su contenido en relación con el peso de la formulación en forma líquida de la presente invención es, por ejemplo, de 1-100 mg/g, 1-50 mg/g, 1-150 mg/g, 5-100 mg/g, 5-50 mg/g, 5-150 mg/g, 10-100 mg/g, 10-50 mg/g, 10-150 mg/g o similares.

5 La composición puede contener manitol.

En la presente invención, "manitol" es un tipo de alcohol de azúcar, clasificado en hexitol, y que se corresponde con una forma reducida de manosa. El manitol contiene un isómero óptico, que incluye la forma D, la forma L y la forma DL, y el uso de cualquiera de ellas no muestra ninguna influencia sobre el efecto de la presente invención. Se prefiere el D-manitol de origen natural. Aunque el manitol incluye una pluralidad de sistemas cristalinos, el uso de cualquiera de ellos no muestra influencia sobre el efecto de la presente invención. En la composición farmacéutica inyectable de la presente invención, el contenido en manitol en relación con el peso de la composición no está particularmente definido. Su contenido en relación con el peso de la formulación en forma líquida de la presente invención es, por ejemplo, de 1-20 mg/g, 1-30 mg/g, 1-50 mg/g, 3-20 mg/g, 3-30 mg/g, 5-20 mg/g, 5-30 mg/g o similar.

10 Cuando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención contiene adicionalmente el péptido (2) como componente (a), la composición contiene además preferiblemente un agente solubilizante para evitar que la solubilidad del péptido se vuelva inestable. A modo de "agente solubilizante", puede usarse un ácido orgánico. Usando un agente solubilizante, el péptido (2) puede disolverse rápidamente en el etapa de disolución de la preparación líquida. Además, 15 para una formulación liofilizada obtenida mediante liofilización de la formulación en una forma líquida de la presente invención, cuando la formulación liofilizada se reconstituye utilizando agua para inyección, puede volver a disolverse rápidamente. Ejemplos específicos del agente solubilizante incluyen ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido acético y ácido trifluoroacético y similares. Se prefieren el ácido cítrico, el ácido láctico y el ácido tartárico, y se prefiere más el ácido tartárico. En la composición farmacéutica inyectable de la presente invención, el contenido en agente 20 solubilizante en relación con el peso de la composición, no está particularmente definido. Su contenido en relación con el peso de la formulación en forma líquida de la presente invención es, por ejemplo, de 1-5 mg/g, 1-10 mg/g, 1-15 mg/g, 1-20 mg/g, 3-10 mg/g, 3-15 mg/g, 3-20 mg/g, 5-10 mg/g, 5-15 mg/g, 5-20 mg/g, 0,1-5 mg/g, 0,1-10 mg/g, 0,1-15 mg/g, 0,1-20 mg/g, 0,3-10 mg/g, 0,3-15 mg/g, 0,3-20 mg/g, 0,5-10 mg/g, 0,5-15 mg/g o 0,5-20 mg/g.

25 Es deseable que la composición contenga además metionina, de cara a la estabilidad del péptido cuando se prepara como una composición de vacuna contra el cáncer. Al contener metionina, se puede evitar una oxidación del residuo de metionina contenido en el péptido (1) cuando se prepara como una composición de vacuna contra el cáncer.

30 La "metionina" en la presente invención es uno de los aminoácidos esenciales y es un aminoácido hidrofóbico que comprende un átomo de azufre en la cadena lateral. Aunque la "metionina" tiene un isómero óptico e incluye una forma D, una forma L y una forma DL, cualquiera de ellas puede usarse sin influir en el efecto de la invención. La metionina 35 se usa con frecuencia como excipiente para productos farmacéuticos, y es preferible una forma L descrita en la Farmacopea Japonesa (16<sup>a</sup> edición). En la composición farmacéutica inyectable de la presente invención, el contenido en metionina en relación con el peso de la composición no está particularmente definido. Su contenido en relación con el peso de la preparación en forma líquida de la presente invención es, por ejemplo, de 1-5 mg/g, 1-10 mg/g, 1-20 mg/g, 1-30 mg/g, 3-10 mg/g, 3-20 mg/g, 3-30 mg/g, 5-10 mg/g, 5-20 mg/g, 5-30 mg/g o similar.

40 Además, la composición farmacéutica inyectable de la presente invención puede comprender apropiadamente, además de los componentes mencionados anteriormente, excipientes generalmente utilizados para formulaciones farmacéuticas tales como un agente estabilizante, agente solubilizante, agente tamponador, agente isotónico y similares, siempre que el efecto de la invención no se vea afectada.

45 La composición farmacéutica inyectable de la presente invención se puede producir mediante un método generalmente utilizado para la producción de productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, se añade agua para inyección en un recipiente adecuado en un ambiente mantenido a una temperatura constante de 5-25°C, y se añaden un péptido y un excipiente que se pesan previamente, mientras se agita suavemente la mezcla. Luego, la mezcla finalmente se ajusta para tener un pH deseado. La mezcla se esteriliza por filtración y de formas similares, y se vierte en un recipiente tal como un vial de vidrio y similares, que se sella con un tapón de goma y similares. Cuando se produce una formulación 50 liofilizada, la formulación obtenida en forma líquida de la presente invención se puede liofiltrar mediante un método ya conocido.

55 Aunque los péptidos de la presente invención también pueden usarse, cada uno individualmente, como un péptido antigénico para una vacuna contra el cáncer, tanto el péptido (1) como el péptido (2) también pueden estar contenidos en una composición de vacuna contra el cáncer. Dado que el péptido (2) se une individualmente al HLA por sí mismo e induce los CTLs, además de producir efectos como péptido auxiliar cuando se usa en combinación con el péptido (1), se espera que una composición de vacuna contra el cáncer que contenga tanto el péptido (1) como el péptido (2) muestre un efecto de vacuna sinérgico. Cuando ambos péptidos están contenidos en una composición de vacuna contra el cáncer, una única composición farmacéutica inyectable de la presente invención que contiene ambos

péptidos puede mezclarse con adyuvante, o dos composiciones farmacéuticas inyectables que contienen cada péptido pueden mezclarse con adyuvante para formar una mezcla de tres materiales.

La formulación en forma líquida de la presente invención, que contiene tanto el péptido (1) como el péptido (2), puede prepararse directamente (en un solo etapa) sometiendo ambos péptidos al método de producción mencionado anteriormente, o también puede obtenerse sometiendo cada péptido a la producción mencionada anteriormente para preparar una formulación líquida individual o una formulación en suspensión y mezclarlas. En una realización preferible, se puede mencionar un método que incluye liofilizar una formulación líquida o una formulación en suspensión que contiene el péptido (1), y añadir una formulación líquida o una formulación en suspensión que contiene el péptido (2) para disolver o suspender la formulación liofilizada que contiene el péptido (1). Alternativamente, se preparan dos tipos de formulaciones liofilizadas que contienen los respectivos péptidos, la formulación liofilizada que contiene el péptido (2) se vuelve a disolver o se suspende de nuevo en una cantidad menor de agua que la formulación líquida o la formulación en suspensión antes de la liofilización, y la solución o la suspensión se añade a una formulación liofilizada que contiene el péptido (1) para disolverla o suspenderla en la misma, por lo que se puede preparar una preparación líquida o una formulación en suspensión que tiene una concentración mayor que la de la formulación líquida o la formulación en suspensión antes de la liofilización.

Si bien el método de preparación de una vacuna contra el cáncer que emplea la composición farmacéutica inyectable de la presente invención no está particularmente limitado, se puede mencionar, por ejemplo, un método de preparación de una vacuna contra el cáncer mezclando con un adyuvante apropiado; un método de preparación de una vacuna contra el cáncer mezclando previamente con un adyuvante apropiado y liofilizando la mezcla y similares; un método de preparación de una vacuna contra el cáncer mezclando la formulación en forma líquida de la presente invención con varios adyuvantes cuando está en uso y similares. Ejemplos del adyuvante incluyen adyuvante con capacidad de sedimentación, adyuvante oleoso y similares. El adyuvante con capacidad de sedimentación es una suspensión de una sustancia inorgánica a la que se adsorben los péptidos. Ejemplos específicos del adyuvante con capacidad de sedimentación incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de aluminio (alumbre), fosfato de calcio, fosfato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio, PEPES, polímero de carboxivinilo y similares. El adyuvante oleoso es una emulsión de aceite en la que una solución acuosa que contiene el péptido está rodeada de aceite mineral para formar micelas para la emulsificación. Ejemplos específicos del adyuvante oleoso incluyen parafina líquida, lanolina, adyuvante de Freund (adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto), Montanide, emulsión de agua en aceite (véase el documento WO 2006/078059) y similares.

Una vacuna contra el cáncer preparada usando la composición farmacéutica inyectable de la presente invención se puede usar para la prevención o el tratamiento del cáncer asociado con un aumento del nivel de expresión del gen WT1, por ejemplo, cáncer hematológico tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, linfoma maligno y similares, y tumores sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, tumor cerebral y similares.

Dado que la composición farmacéutica inyectable de la presente invención puede conservar de manera estable un péptido antígenico del cáncer, que es el ingrediente activo, se pueden seleccionar varias formas de administración. Específicamente, se pueden mencionar la administración oral, transnasal, pulmonar, transdérmica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal y similares, y se puede preparar una vacuna contra el cáncer mediante el método mencionado anteriormente según el objeto de uso. Generalmente, como vía de administración preferible para una inmunoestimulación con una vacuna contra el cáncer, se conoce la administración parenteral y, por ejemplo, se puede mencionar la administración intraperitoneal, la administración subcutánea, la administración intradérmica, la administración intramuscular, la administración intravenosa, así como la administración transnasal, la administración transdérmica y similares. Entre ellas, se pueden mencionar preferentemente la administración mediante inyección, tal como la administración subcutánea, la administración intradérmica, la administración intraperitoneal, la administración intramuscular, y similares.

### Ejemplos

La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos, Ejemplos comparativos, Ejemplos experimentales y similares, que no deben interpretarse como limitativos.

Como péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos mostrada por Trp-Ala-Pro-Val-Leu-Asp-Ala-Pro-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO : 1) (péptido (2)), se utilizó un péptido producido por el método descrito en el documento de patente (WO 2010/123065); como trehalosa, se usó "trehalosa SG (fabricada por Hayashibara Biochemical Lab)" que es un hidrato de trehalosa; y como D-manitol, se usó "mannit S (fabricado por Mitsubishi Shoji Foodtech) o D-(+)-manitol bajo en endotoxinas (fabricado por Merck)". Como trometamol, se utilizó "trometamol (fabricado por Nacalai Tesque)"; como histidina, se utilizó "histidina (fabricada por Nacalai Tesque)"; como L-arginina, se usó "clorhidrato de L-arginina (fabricado por Nacalai Tesque)"; y como meglumina, se usó "meglumina (fabricada por Nacalai Tesque)". Como ácido láctico, se utilizó "ácido láctico (fabricado por Nacalai Tesque)"; como ácido tartárico, se utilizó "ácido L(+)-tartárico, en polvo (fabricado por Merck)"; y como ácido cítrico, se utilizó "ácido cítrico monohidrato (fabricado por Nacalai Tesque)". Como metionina, se usó "L-metionina (fabricada por Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.)". Como ajustador de pH, se utilizó ácido clorhídrico, "1 mol/l de ácido clorhídrico (fabricado por Nacalai

Tesque)"; como hidróxido de sodio, se utilizó "1 mol/l de solución de hidróxido de sodio (fabricada por Nacalai Tesque)"; y como dihidrogenofosfato de sodio, se usó "dihidrogenofosfato de sodio (fabricado por Nacalai Tesque)". Como Montanide, se utilizó "(Montanide ISA 51 VG (fabricado por SEPPIC)".

Síntesis del péptido

- 5 Síntesis del péptido representado por la fórmula (1) (péptido (1))

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

(Síntesis de C(Npys)RMFPNAPYL)

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

bomba: fabricada por Shimazu; LC-8A

columna: YMC ODS-A 3 cm φ × 25 cm L, 10 μm

material eluido 1: H<sub>2</sub>O/0,1% de TFA

material eluido 2: CH<sub>3</sub>CN/0,1% de TFA

25 caudal: 20 ml/min

detección: UV 220 nm

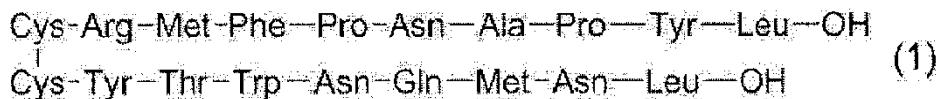
La solución de péptido bruto se inyectó en una columna equilibrada con el 15% del material eluido 2. A continuación, la concentración del material eluido 2 se elevó al 37% durante 10 min y, a continuación, se elevó a una tasa del 0,24% por min. Las fracciones que contenían el producto objeto se recogieron y se liofilizaron para proporcionar H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (53 mg).

Espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1366,1 [M+1]+

(Calculada = 1366,6)

Etapa 2. Síntesis del enlace disulfuro (H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH)

- 35 Síntesis del compuesto representado por la fórmula (1):



en donde el enlace entre Cys y Cys es un enlace disulfuro, Leu-OH muestra que el extremo C-terminal de Leu es un grupo carboxilo libre y otro enlace es un enlace peptídico.

40 H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH (50 mg) obtenido en el etapa 1 y H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH (es decir, CYTNQNMNL (SEQ ID NO: 4)) (43 mg) sintetizado por un método conocido (por ejemplo, el documento WO 07/063903) se mezclaron, se añadió DMSO (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de reacción se diluyó con agua TFA al 0,1% (5 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa.

bomba: fabricada por Shimazu; LC-8A

45 columna: YMC ODS-A 3 cm φ × 25 cm L, 10 μm

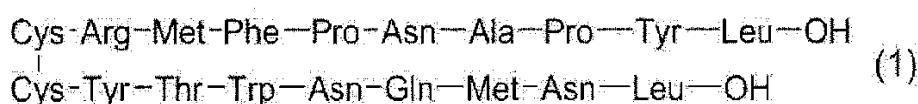
material eluido 1: H<sub>2</sub>O/0,1% de TFA

material eluido 2: CH<sub>3</sub>CN/0,1% de TFA

caudal: 20 ml/min

detección: UV 220 nm

- 5 La solución de reacción se inyectó en una columna equilibrada con el 25% del material eluido 2. A continuación, la concentración del material eluido 2 se elevó a una tasa del 0,25% por minuto. Las fracciones que contenían el producto objeto se recogieron, se liofilizaron, se volvieron a purificar mediante HPLC de fase inversa y se liofilizaron para proporcionar el enlace disulfuro (H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) (es decir, un péptido representado por la fórmula (1) (péptido (1)) (21 mg).
- 10 Espectrometría de masas: LC-ESI/MS m/z = 1191,8 [M+2]2+
- (Calculada = 1191,6)



en donde el enlace entre Cys y Cys es un enlace disulfuro, Leu-OH muestra que el extremo C-terminal de Leu es un grupo carboxilo libre, y otro enlace es un enlace peptídico.

- 15 Preparación de la formulación líquida o la formulación en suspensión

Ejemplo 1

- El péptido (1) mencionado anteriormente como péptido (componente (a)) y trehalosa como componente (b) se disolvieron en agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 1, y la mezcla se ajustó a pH 1 con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio como ajustador de pH (componente (c)). Despues de la filtración a través de un filtro de esterilización de 0,2 µm, se llenó un vial de vidrio con 1 ml de la mezcla y se selló herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvo la formulación líquida del Ejemplo 1.

Ejemplos 2-10

- De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (1), trehalosa, un ajustador de pH (ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio) y agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 1 o 2, llenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 2, 3, 5-8 y 10.

- De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (1), trehalosa, un ajustador de pH (ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio) y agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 1 o 2, llenando un vial, y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 4 y 9.

Tabla 1

Componente	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5
péptido (1) (mg)	10	10	10	10	10
trehalosa (mg)	10	10	10	10	10
ácido clorhídrico			c.s.		
hidróxido de sodio			c.s.		
agua para inyección			c.s.		
pH	1	1,5	2	2,5	3
cantidad total			2 g		

Tabla 2

Componente	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10
péptido (1) (mg)	10	10	10	10	10
trehalosa (mg)	20	20	20	20	20
ácido clorhídrico			c.s.		
hidróxido de sodio			c.s.		
agua para inyección			c.s.		
pH	1	1,5	2	2,5	3
cantidad total			2 g		

## Ejemplos 11-19 (no según la invención)

- 5 De la misma manera que en el Ejemplo 1, el péptido mostrado en SEQ ID NO: 1 (WAPVLDFAAPPGASAYGSL) (de aquí en adelante péptido (2)) como componente (a), trehalosa, un ajustador de pH (ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio), y agua para inyección, se prepararon en las cantidades descritas en la Tabla 3 o 4, se llenaron en un vial y se sellaron herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 12, 15 y 18.
- 10 De la misma manera que en el ejemplo 1, el péptido mostrado en SEQ ID NO: 1 (WAPVLDFAAPPGASAYGSL) (en adelante péptido (2)) como componente (a), trehalosa, un ajustador de pH (ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio), y el agua para inyección se prepara en las cantidades descritas en la Tabla 3 o 4, llenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 11, 13, 14, 16, 17 y 19.

Tabla 3

componente	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 14	Ejemplo 15
péptido (2) (mg)	2	2	2	2	2
trehalosa (mg)	10	10	10	10	10
ácido clorhídrico			c.s.		
hidróxido de sodio			c.s.		
agua para inyección			c.s.		
pH	2	3	4	5	6
cantidad total			2 g		

15

Tabla 4

componente	Ejemplo 16	Ejemplo 17	Ejemplo 18	Ejemplo 19
péptido (2) (mg)	2	2	2	2
trehalosa (mg)	10	10	10	10
ácido clorhídrico			c.s.	
hidróxido de sodio			c.s.	
agua para inyección			c.s.	
pH	7	8	9	10
cantidad total			2 g	

## Ejemplos 20-24

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (1), trehalosa, D-manitol, agua para inyección, un ajustador de pH (ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio) en las cantidades descritas en la Tabla 5, rellenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 20-24.

5

Tabla 5

componente	Ejemplo 20	Ejemplo 21	Ejemplo 22	Ejemplo 23	Ejemplo 24
péptido (1) (mg)	10	20	20	20	20
trehalosa (mg)	20	20	20	20	20
D-manitol (mg)	10	10	10	10	10
ácido clorhídrico			c.s.		
agua para inyección			c.s.		
pH	1	1,5	2	2,5	3
cantidad total			2 g		

## Ejemplo 25

El péptido (1) y la trehalosa preparados en las cantidades descritas en la Tabla 6, se añadieron a una cantidad adecuada de agua para inyección y la mezcla se dispersó mediante una máquina agitadora, después de lo cual el pH se ajustó a 4 con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio como ajustador de pH, para proporcionar la formulación en suspensión del Ejemplo 25.

10

## Ejemplos 26-29

De la misma manera que en el Ejemplo 25, se añadieron el péptido (1) y trehalosa preparados en las cantidades descritas en la Tabla 6 a una cantidad adecuada de agua para inyección, y se usó el ajustador de pH descrito en la Tabla 6 y se ajustó al pH de la Tabla 6 para proporcionar las formulaciones en suspensión de los Ejemplos 26-29.

15

Tabla 6

componente	Ejemplo 25	Ejemplo 26	Ejemplo 27	Ejemplo 28	Ejemplo 29
péptido (1) (mg)	10	10	10	10	10
trehalosa (mg)	10	10	10	10	10
ácido clorhídrico			c.s.		
hidróxido de sodio			c.s.		
agua para inyección			c.s.		
pH	4	6	7	8	10
cantidad total			2 g		

## Ejemplo 30 (no según la invención)

El péptido (2) como péptido (componente (a)), trehalosa (componente (b)), trometamol como ajustador de pH (componente (c)) se disolvieron en agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 7. Después de la filtración a través de un filtro de esterilización de 0,2 µm, se llenó 1 ml de la mezcla en un vial de vidrio, y se selló herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvo la formulación líquida del Ejemplo 30.

20

## Ejemplos 31-34 (no según la invención)

De la misma manera que en el Ejemplo 30, se prepararon el péptido (2), trehalosa, un ajustador de pH y agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 7, se llenaron en un vial y se sellaron herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 31-34.

25

Tabla 7

componente	Ejemplo 30	Ejemplo 31	Ejemplo 32	Ejemplo 33	Ejemplo 34
péptido (2) (mg)	20	20	20	20	20
trehalosa (mg)	20	20	20	20	20
trometamol (mg)	20	-	-	-	-
histidina (mg)	-	40	-	-	-
L-arginina (mg)	-	-	20	-	-
meglumina (mg)	-	-	-	20	-
hidrogenofosfato disódico (mg)	-	-	-	-	20
ácido clorhídrico				c.s.	
agua para inyección				c.s.	
pH	7	7	7	7	7
cantidad total			2 g		

## Ejemplos 35-37 (no según la invención)

5 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (2), trehalosa, los agentes solubilizantes (ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico), un ajustador de pH (ácido clorhídrico) y agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 8, llenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 35-37.

Tabla 8

componente	Ejemplo 35	Ejemplo 36	Ejemplo 37
péptido (2) (mg)	100	100	100
trehalosa (mg)	500	500	500
ácido cítrico (mg)	55	-	-
ácido láctico (mg)	-	50	-
ácido tartárico (mg)	-	-	50
ácido clorhídrico		c.s.	
agua para inyección		c.s.	
pH	2,6	2,8	2,5
cantidad total		10 g	

## 10 Ejemplos 38-43 (no según la invención)

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (2), trehalosa, un agente solubilizante (ácido tartárico), un ajustador de pH (ácido clorhídrico) y agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 9 o 10, llenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 38-43.

Tabla 9

componente	Ejemplo 38	Ejemplo 39	Ejemplo 40
péptido (2) (mg)	150	150	200
trehalosa (mg)	200	800	200
ácido tartárico (mg)	30	50	30
ácido clorhídrico		c.s.	
agua para inyección		c.s.	
pH	2,5	2,6	2,5
cantidad total	10 g		20 g

Tabla 10

componente	Ejemplo 41	Ejemplo 42	Ejemplo 43
péptido (2) (mg)	200	113	113
trehalosa (mg)	800	225	300
ácido tartárico (mg)	50	22,5	37,5
ácido clorhídrico		c.s.	
agua para inyección		c.s.	
pH	2,5	2,5	2,5
cantidad total	20 g		15 g

## 5 Ejemplos 44-47 (no según la invención)

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (2), trehalosa, un agente solubilizante (ácido tartárico), un ajustador de pH (ácido clorhídrico) y agua para inyección en las cantidades descritas en la Tabla 11, rellenando en un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 44-47.

10

Tabla 11

componente	Ejemplo 44	Ejemplo 45	Ejemplo 46	Ejemplo 47
péptido (2) (mg)	150	151	151	151
trehalosa (mg)	113	113	113	113
ácido tartárico (mg)	-	7,5	22,5	37,5
ácido clorhídrico		c.s.		
agua para inyección		c.s.		
pH	2,5	2,6	2,5	2,5
cantidad total		15 g		

## Ejemplos 48-50

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (1), trehalosa, D-maniitol, agua para inyección y un ajustador de pH (ácido clorhídrico) en las cantidades descritas en la Tabla 12, se llenaron en un vial y se sellaron herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 48-50.

15

Tabla 12

componente	Ejemplo 48	Ejemplo 49	Ejemplo 50
péptido (1) (mg)	91	92	92
trehalosa (mg)	46	138	46
D-manitol (mg)	46	92	138
ácido clorhídrico		c.s.	
agua para inyección		c.s.	
pH	2,3	2,3	2,3
cantidad total	9,1 g		9,2 g

## Ejemplos 51-54

- 5 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (1), trehalosa, D-manitol, metionina, agua para inyección y un ajustador de pH (ácido clorhídrico) en las cantidades descritas en la Tabla 13, rellenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvo la formulación líquida del Ejemplo 52.
- 10 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (1), trehalosa, D-manitol, metionina, agua para inyección y un ajustador de pH (ácido clorhídrico) en las cantidades descritas en la Tabla 13, rellenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 51, 53 y 54.

Tabla 13

componente	Ejemplo 51	Ejemplo 52	Ejemplo 53	Ejemplo 54
péptido (1) (mg)	20	20	20	20
trehalosa (mg)	10	20	10	20
D-manitol (mg)	10	10	10	10
L-metionina (mg)	15	15	15	15
ácido clorhídrico		c.s.		
agua para inyección		c.s.		
pH	2,5	2,5	3	3
cantidad total		2 g		

## Ejemplos 55-58 (no según la invención)

- 15 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (2), trehalosa, el ácido tartárico, agua para inyección y un ajustador de pH (ácido clorhídrico) en las cantidades descritas en la Tabla 14, rellenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 55 y 56.
- 20 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se prepararon el péptido (2), trehalosa, el ácido tartárico, agua para inyección y un ajustador de pH (ácido clorhídrico) en las cantidades descritas en la Tabla 14, rellenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 57 y 58.

Tabla 14

componente	Ejemplo 55	Ejemplo 56	Ejemplo 57	Ejemplo 58
péptido (2) (mg)	18	18	18	18
trehalosa (mg)	36	24	36	24
ácido tartárico (mg)	3,6	3,6	3,6	3,6
ácido clorhídrico		c.s.		

componente	Ejemplo 55	Ejemplo 56	Ejemplo 57	Ejemplo 58
agua para inyección		c.s.		
pH	2,5	2,5	3	3
cantidad total		2,4 g		

## Ejemplos 59-66

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se preparan el péptido (1), el péptido (2), trehalosa, D-manitol, L-metionina, ácido tartárico, agua para inyección y un ajustador de pH (ácido clorhídrico) en las cantidades descritas en la Tabla 5 15 o 16, rellenando un vial y sellando herméticamente con un tapón de goma de butilo, con lo que se obtuvieron las formulaciones líquidas de los Ejemplos 59-66.

Tabla 15

componente	Ejemplo 59	Ejemplo 60	Ejemplo 61	Ejemplo 62
péptido (1) (mg)	40	40	40	40
péptido (2) (mg)	30	30	30	30
trehalosa (mg)	30	40	45	50
D-manitol (mg)	10	10	10	10
L-metionina (mg)	30	30	30	30
ácido tartárico (mg)	6	6	6	6
ácido clorhídrico		c.s.		
agua para inyección		c.s.		
pH	2,5	2,5	2,5	2,5
cantidad total		4 g		

Tabla 16

componente	Ejemplo 63	Ejemplo 64	Ejemplo 65	Ejemplo 66
péptido (1) (mg)	40	40	40	40
péptido (2) (mg)	30	30	30	30
trehalosa (mg)	30	40	45	50
D-manitol (mg)	10	10	10	10
L-metionina (mg)	30	30	30	30
ácido tartárico (mg)	6	6	6	6
ácido clorhídrico		c.s.		
agua para inyección		c.s.		
pH	3	3	3	3
cantidad total		4 g		

10

## Preparación de la formulación liofilizada

Ejemplos 1A-66A (solo las formulaciones que comprenden el péptido (1) están de acuerdo con la invención)

Las formulaciones líquidas o las formulaciones en suspensión producidas en los Ejemplos 1, 4, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 51, 53, 54 y 57-66 se llenan en viales de vidrio, se colocan en una liofilizadora y se liofilizan para proporcionar las formulaciones liofilizadas de los Ejemplos 1A, 4A, 6A, 9A, 11A, 13A, 14A, 16A, 17A, 19A, 20A, 51A, 53A, 54A y 57A-66A. La liofilización se realiza en condiciones que incluyen congelar una formulación líquida o una formulación en suspensión a cerca de -40°C, reducir la presión en la liofilizadora al vacío, aumentando

simultáneamente la temperatura en la liofilizadora a cerca de -20°C y secando durante aproximadamente 20 h, y aumentando de la temperatura en la liofilizadora hasta cerca de 30°C y secando durante aproximadamente 12 h.

Las formulaciones líquidas producidas en los Ejemplos 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 18, 21-50, 52, 55 y 56 se llenaron en viales de vidrio, se colocaron en una liofilizadora y se liofilizaron para proporcionar las formulaciones liofilizadas de los

- 5 Ejemplos 2A, 3A, 5A, 7A, 8A, 10A, 12A, 15A, 18A, 21A-50A, 52A, 55A y 56A. La liofilización se realizó en condiciones que incluían congelar una formulación líquida o una formulación en suspensión a cerca de -40°C, reducir la presión en la liofilizadora al vacío, aumentar simultáneamente la temperatura en la liofilizadora a cerca de -20°C y secar durante aproximadamente 20 h, y aumentar la temperatura en la liofilizadora hasta cerca de 30°C y secar durante aproximadamente 12 h.

10 Ejemplo experimental 1. Evaluación de la estabilidad de las formulaciones líquidas y en suspensión

Las formulaciones líquidas de los Ejemplos 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 18, 21-26, 30-34 y 52 se almacenaron a 25°C durante 1 semana y se evaluó la pureza. La pureza se midió mediante un método de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (longitud de onda de detección: 220 nm) utilizando una columna de fase inversa C18 (2,1 mm × 150 mm, 1,7 µm o 4,6 mm × 150 mm, 5 µm) y agua pura, acetonitrilo, ácido trifluoroacético como fase móvil.

- 15 Usando el área del pico medida por este método, se calculó la pureza relativa (frente al valor inicial) basada en la pureza del péptido y la pureza antes del almacenamiento como el 100% con la siguiente fórmula.

$$\text{pureza del péptido (\%)} = \text{área del pico del péptido/área del pico total que contiene una sustancia relacionada} \times 100$$

$$\text{pureza relativa (frente al valor inicial) (\%)} = \text{pureza del péptido en una muestra almacenada/pureza del péptido antes del almacenamiento} \times 100$$

- 20 Los resultados se muestran en la Tabla 17. Cada formulación mostraba no menos del 80% a 25°C, 1 semana, y se pudo obtener una formulación estable.

Tabla 17

	pureza (frente al valor inicial) (%)	
	antes del almacenamiento	25°C, 1 semana
Ejemplo 2	100	94
Ejemplo 3	100	99
Ejemplo 5	100	99
Ejemplo 7	100	94
Ejemplo 8	100	98
Ejemplo 10	100	100
Ejemplo 12	100	98
Ejemplo 15	100	100
Ejemplo 18	100	100
Ejemplo 21	100	94
Ejemplo 22	100	98
Ejemplo 23	100	99
Ejemplo 24	100	100
Ejemplo 25	100	99
Ejemplo 26	100	94
Ejemplo 30	100	100
Ejemplo 31	100	100
Ejemplo 32	100	100
Ejemplo 33	100	100
Ejemplo 34	100	100
Ejemplo 52	100	99

## Ejemplo experimental 2. Evaluación de la estabilidad de la formulación liofilizada

Las formulaciones liofilizadas de los Ejemplos 5A, 10A, 12A, 15A, 18A, 23A-26A, 30A-43A, 48A-50A, 52A, 55A y 56A se conservaron a 60°C durante 2 semanas, se añadió agua para inyección para convertirlas en formulaciones líquidas, y se evaluó la pureza. La pureza se midió y se calculó de la misma manera que en el Ejemplo experimental 1.

- 5 Los resultados se muestran en la Tabla 18. Cada formulación mostraba no menos del 80% a 60°C, 2 semanas, y se pudo obtener una formulación estable.

Tabla 18

	pureza (frente al valor inicial) (%)	
	antes del almacenamiento	60°C, 2 semanas
Ejemplo 5A	100	95
Ejemplo 10A	100	95
Ejemplo 12A	100	82
Ejemplo 15A	100	100
Ejemplo 18A	100	100
Ejemplo 23A	100	92
Ejemplo 24A	100	99
Ejemplo 25A	100	98
Ejemplo 26A	100	98
Ejemplo 30A	100	99
Ejemplo 31A	100	100
Ejemplo 32A	100	100
Ejemplo 33A	100	99
Ejemplo 34A	100	99
Ejemplo 35A	100	91
Ejemplo 36A	100	92
Ejemplo 37A	100	97
Ejemplo 38A	100	97
Ejemplo 39A	100	98
Ejemplo 40A	100	97
Ejemplo 41A	100	99
Ejemplo 42A	100	97
Ejemplo 43A	100	97
Ejemplo 48A	100	96
Ejemplo 49A	100	94
Ejemplo 50A	100	94
Ejemplo 52A	100	96
Ejemplo 55A	100	97
Ejemplo 56A	100	96

## Ejemplo experimental 3. Evaluación de la capacidad para volver a solubilizar la formulación liofilizada

- 10 Las formulaciones liofilizadas de los Ejemplos 44A-47A se almacenaron a 40°C durante 1 mes, y la propiedad de disolución cuando se añadía agua para inyección para reconstituir el agua, se confirmó mediante observación visual.

Los resultados se muestran en la Tabla 19. Los resultados de la Tabla 19 sugieren que la adición por adelantado de ácido tartárico como agente solubilizante, mejora la capacidad para volverse a solubilizar.

Tabla 19

	Capacidad de volverse a solubilizar
Ejemplo 44A	Agitar a mano durante 5 minutos después de añadir agua para inyección, no provocaba la disolución. Se disolvía después de agitar con una mezcladora manual durante 3 min y sometiendo a ultrasonidos durante varios segundos.
Ejemplo 45A	Agitar a mano durante 2 min después de añadir agua para inyección, no provocaba una disolución. Se disolvía después de agitar con una mezcladora manual durante 3 min.
Ejemplo 46A	Se disolvía rápidamente después de la adición de agua para inyección.
Ejemplo 47A	Se disolvía rápidamente después de la adición de agua para inyección.

5 Ejemplo experimental 4. Confirmación de la actividad inductora de CTLs específicos

Se obtuvo la formulación líquida del Ejemplo 67 que contenía péptido (1), trehalosa, D-manitol, metionina, agua para inyección, un ajustador de pH (ácido clorhídrico) con la misma proporción de composición que en el Ejemplo 51 y con un pH ajustado a 2,7. La formulación líquida del Ejemplo 67 se llenó en un vial con 2 ml, se colocó en una liofilizadora y se liofilizó para proporcionar la formulación liofilizada del Ejemplo 67A. La formulación liofilizada del Ejemplo 67A que contenía el péptido (1) y la formulación liofilizada del Ejemplo 55A que contenía el péptido (2), se mezclaron con adyuvante para proporcionar una composición de vacuna contra el cáncer. Además, la estabilidad de la formulación liofilizada del Ejemplo 67A se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 2. Como resultado, la pureza relativa (frente al valor inicial) después del almacenamiento a 25°C durante 3 meses, era del 100%, y se pudo obtener una formulación estable.

15 1) Preparación de la composición de la vacuna contra el cáncer

La formulación liofilizada del Ejemplo 55A que contenía el péptido (2) se reconstituyó en 1,2 ml de agua para inyección. La solución reconstituida se recogió en 1 ml, se añadió y se volvió a disolver en la formulación liofilizada del Ejemplo 67A que contenía el péptido (1) para proporcionar la formulación líquida del Ejemplo 68. La formulación líquida (0,9 ml) se mezcló con Montanide (0,9 ml) como adyuvante y la mezcla se emulsionó para proporcionar la composición de vacuna contra el cáncer del Ejemplo 67.

20 2) Evaluación de la actividad inductora de CTLs

La capacidad de inducir CTLs de la composición de vacuna contra el cáncer mencionada anteriormente, se evaluó mediante una prueba de inducción de CTLs *in vivo* usando ratones transgénicos HLA-A\*02:01 y ratones transgénicos HLA-A\*24:02.

25 Un ratón transgénico HLA-A\*02:01, que es defectuoso para el MHC de ratón, expresa un HLA quimera de MHC HLA-A\*02:01 humano y MHC H-2D<sup>b</sup> de ratón, así como HLA-DRB1\*01:01. Usando ese ratón, se puede seleccionar un péptido capaz de inducir CTLs en seres humanos positivos para HLA-A\*02 (*Eur J Immunol*. 2004; 34:3060-9). Por otro lado, el ratón transgénico HLA-A\*24:02 (C57BL/6CrHLA-A2402/K<sup>b</sup>) es un ratón que expresa un HLA quimera de HLA-A\*24:02, que es MHC humano y H-2K<sup>b</sup>, que es MHC de ratón. Usando ese ratón, se puede seleccionar un péptido capaz de inducir CTLs en seres humanos positivos para HLA-A\*24 (*Int J Cancer*. 2002; 100:565-70).

30 La composición de vacuna contra el cáncer mencionada anteriormente se administró por vía intradérmica en dos sitios en la base de la cola del ratón, con 50 µl/sitio. Para la evaluación de la inducción de los linfocitos T específicos del péptido, en la composición de vacuna contra el cáncer, se usó el kit de ensayo ELISPOT para IFNγ. Una semana después de la administración, el ratón fue sacrificado con gas CO<sub>2</sub>, se aisló el bazo y se prepararon los esplenocitos.

35 La placa de ELISPOT se trató con un anticuerpo anti-IFNγ de ratón, el día anterior a la preparación de los esplenocitos y se bloqueó con medio RPMI1640 que contenía FBS al 10%, el día de la preparación de los esplenocitos. Los esplenocitos preparados obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*02:01 se sembraron con 1,25 × 10<sup>5</sup> células/pocillo, y los esplenocitos preparados obtenido a partir de los ratones HLA-A\*24:02 se sembraron con 5×10<sup>5</sup> células/pocillo, cada uno en la placa ELISPOT bloqueada. El péptido (SEQ ID NO: 3, 5) se disolvió en DMSO a

40 40 mg/mL y se diluyó adicionalmente hasta 40 g/mL con medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10%. El péptido diluido (SEQ ID NO: 3) se añadió a los esplenocitos obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*02:01 con una concentración final de 10 µg/mL. Además, se añadió el péptido diluido (SEQ ID NO: 5) a los esplenocitos obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*24:02 con una concentración final de 10 µg/mL. A partir de ese momento, las células se cultivaron durante 18-20 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> para estimular de nuevo con el péptido *in vitro*. Después del cultivo, se eliminó el material sobrenadante y se permitió que la placa ELISPOT desarrollara color de acuerdo con

el protocolo adjunto. El número de manchas que desarrollaron color se midió mediante un aparato ImmunoSpot Analyzer (fabricado por C.T.L.).

Los resultados del ensayo de ELISPOT para IFNy usando el ratón transgénico HLA-A\*02:01 se muestran en la Fig. 1, y los resultados del ensayo ELISPOT para IFNy usando el ratón transgénico HLA-A\*24:02 se muestran en la Fig. 2.

- 5 En las Figs. 1 y 2, el eje vertical muestra el número de células que reaccionaban en las células sembradas, y el eje horizontal muestra el péptido sometido a pulsos *in vitro*. En la Fig. 1, la barra negra muestra los resultados del cultivo de esplenocitos obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*02:01 sometiendo a pulsos el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 3, y la barra blanca muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, una diferencia en los valores de la barra negra y la barra blanca muestra el número de CTLs específicos de péptido, y se mostró que la administración de la composición de vacuna contra el cáncer mencionada anteriormente inducía CTLs específicos para el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 3 en el cuerpo del ratón. En la Fig. 1, la barra blanca no muestra ningún valor. Esto significa ausencia de reacción de los esplenocitos del ratón transgénico HLA-A\*02:01 cuando el péptido objeto no se sometió a pulsos. Como resultado de esta prueba, se confirmó la producción de IFNy específico para el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 3 en los esplenocitos obtenidos a partir de ratón transgénico HLA-A\*02:01.
- 10 15 En la Fig. 2, además, la barra negra muestra los resultados del cultivo de esplenocitos obtenidos a partir de ratones transgénicos HLA-A\*24:02 sometiendo a pulsos el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 5, y la barra blanca muestra los resultados del cultivo sin pulsos. Es decir, una diferencia en los valores de la barra negra y la barra blanca muestra el número de células reactivas con el péptido, y se mostró que la administración de la composición de vacuna contra el cáncer mencionada anteriormente inducía CTLs específicos para el péptido que se muestra en SEQ ID. NO: 5 en el cuerpo del ratón. En la Fig. 2, la barra blanca no muestra ningún valor. Esto significa ausencia de reacción de los esplenocitos del ratón transgénico HLA-A\*24:02 cuando el péptido objeto no se sometió a pulsos. Como resultado de esta prueba, se confirmó la producción de IFNy específico para el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 5 en los esplenocitos obtenidos a partir de ratón transgénico HLA-A\*24:02.

20 25 Por ello, se aclaró que la composición de vacuna contra el cáncer mencionada anteriormente puede inducir CTLs específicos para los péptidos que se muestran en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 *in vivo*. Por lo tanto, se sugiere que una formulación preparada de nuevo a partir de una formulación en la que el péptido que incluye el péptido (1) es estable y una formulación en la que el péptido que incluye el péptido (2) es estable, puede usarse como vacuna contra el cáncer.

#### Aplicabilidad industrial

30 35 De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar una formulación en suspensión que contiene el péptido del antígeno del cáncer obtenido a partir de la proteína WT1 y que muestra una buena capacidad de suspensión, y una formulación liofilizada obtenida mediante la liofilización de la formulación en suspensión y que tiene una estabilidad elevada, y el péptido se puede usar como vacuna contra el cáncer.

Esta solicitud se basa en un documento de solicitud de patente nº 2014-197667 presentado en Japón (fecha de presentación: 27 de septiembre de 2014)

#### **Lista de secuencias**

- <110> Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.
- <120> Composición farmacéutica para inyección
- <130> 092363
- 40 <150> JP 2014-197667
- <151> 27-09-2014
- <160> 6
- <210> 1
- <211> 18
- 45 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> péptido

ES 2 916 834 T3

<400> 1

Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu

<210> 2

5 <211> 449  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 916 834 T3

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

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

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp

# ES 2 916 834 T3

355                    360                    365  
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
370                    375                    380  
  
Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
385                    390                    395                    400  
  
His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
405                    410                    415  
  
Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
420                    425                    430  
  
Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
435                    440                    445

Leu

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> péptido

<400> 3

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1                    5

10 <210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 4

Cys Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1                    5                    10

<210> 5

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 5

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

25 1                    5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 916 834 T3

<220>

<223> péptido

<400> 6

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

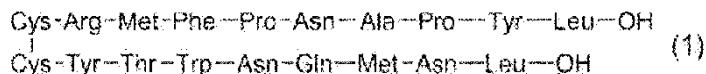
1

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica inyectable que comprende los siguientes componentes:

(a) uno o más tipos de péptidos seleccionados a partir de un péptido representado por la fórmula (1):



- 5 en donde el enlace entre Cys y Cys es un enlace disulfuro, Leu-OH muestra que el extremo C-terminal de Leu es un grupo carboxilo libre y otro enlace es un enlace peptídico y sus sales,
- (b) trehalosa o hidrato de trehalosa, y
- (c) un ajustador de pH.
2. La composición según la reivindicación 1, que comprende además metionina, preferiblemente L-metionina.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende además manitol, preferiblemente D-manitol.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene un pH de 1-3.
- 15 5. La composición según la reivindicación 1, en la que el componente (a) comprende uno o más tipos de péptidos seleccionados a partir de un péptido representado por la fórmula (1) y una sal del mismo, y uno o más tipos de péptidos seleccionados a partir de un péptido mostrado por Trp-Ala-Pro-Val-Leu-Asp-Phe-Ala-Pro-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 1) y una sal del mismo, preferiblemente que comprende además manitol, preferiblemente D-manitol y/o metionina, preferiblemente L-metionina.
6. La composición según la reivindicación 5, que comprende además un agente solubilizante, preferiblemente ácido tartárico.
- 20 7. La composición según la reivindicación 5 o 6, que tiene un pH de 2-3.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es una formulación líquida, una formulación en suspensión o una formulación liofilizada.
- 25 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que se produce añadiendo una composición que comprende uno o más tipos de péptidos seleccionados a partir de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por Trp-Ala-Pro-Val-Leu-Asp-Phe-Ala-Pro-Pro-Gly-Ala-Ser-Ala-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 1) y una sal del mismo, que está en forma de una formulación líquida, a una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está en forma de formulación liofilizada.
10. La composición según la reivindicación 9, que es una formulación líquida o una formulación en suspensión.
11. Una composición de vacuna contra el cáncer que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

Fig. 1

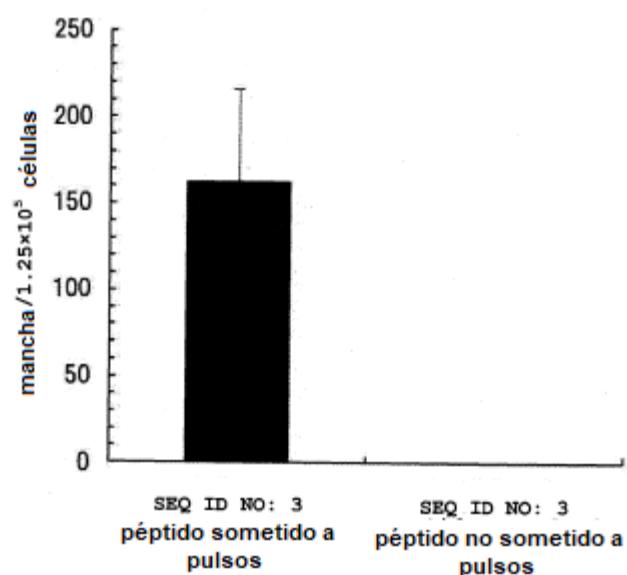


Fig. 2

