



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 435 650**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 14/71** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2006 E 10177960 (1)**  
⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2289533**

⑭ Título: **Péptidos epítopos derivados del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular y vacunas que contienen estos péptidos**

⑯ Prioridad:

**28.02.2005 US 657527 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.12.2013**

⑬ Titular/es:

**ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (100.0%)**  
2-1, Sakado 3-chome Takatsu-ku  
Kawasaki-shi Kanagawa 213-0012, JP

⑭ Inventor/es:

**TAHARA, HIDEAKI;**  
**TSUNODA, TAKUYA;**  
**SHIBUYA, MASABUMI y**  
**NAKATSURU, SHUICHI**

⑯ Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 435 650 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

5 Péptidos epítopos derivados del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular y vacunas que contienen estos péptidos

10 **Campo de la invención**

15 La presente invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

20 La presente divulgación se refiere a péptidos que son extremadamente eficaces como vacunas contra el cáncer, y fármacos para el tratamiento y prevención de tumores, que contienen estos péptidos.

25 **Antecedentes de la invención**

30 El crecimiento tumoral en general está limitado a 1~2 mm<sup>3</sup> en ausencia de un suministro de sangre vascularizada, y la angiogénesis tiene un papel crítico en la invasión, crecimiento y metástasis de tumores (Folkman, J. (2002) Semin. Oncol. 29: 15-8, Folkman, J. (1996) Nat. Med. 2: 167-8, Kerbel y Folkma, (2002). Nature Rev. Cancer. 2: 727-39, Brown *et al.*, (1995) Hum. Pathol. 26: 86-91, Eberhard *et al.*, (2000) Cancer Res. 60: 1388-93). También se

35 ha mostrado que la inhibición de la angiogénesis tumoral se asocia con la supresión de la progresión tumoral. Para alcanzar la supresión de la angiogénesis, un número de investigadores han estado examinando estrategias terapéuticas que se dirigen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y al receptor de VEGF (VEGFR), que desempeñan papeles críticos en la regulación del proceso de angiogénesis. Estos estudios han mostrado que el crecimiento tumoral se puede suprimir con éxito *in vitro* e *in vivo* usando anticuerpos monoclonales, receptores recombinantes o inhibidores para la transducción de señales (El-Mousawi *et al.*, (2003) J.Biol.Chem. 278: 46681-91, Stefanik *et al.*, (2001) J. Neurooncol. 55: 91-100, Wood *et al.*, (2000) Cancer Res. 60: 2178-89, Luttun *et al.*, (2002) Nat. Med. 8: 831-40, Lyden *et al.*, (2001) Nat. Med. 7: 1194-201, Lu *et al.*, (2001) Cancer Res. 61: 7002-8). Sin embargo, estas estrategias requieren la administración frecuente o continua de los reactivos a niveles de dosis relativamente altos, que pueden estar asociados con inconveniencias y efectos secundarios significativos.

40 VEGF se une a dos receptores tirosina quinasa relacionados, VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (KDR), que se expresan intensamente en células endoteliales en tejido tumoral pero no en tejido normal (Risau, W. (1997) Nature. 386: 671-4, Ferrara y Davis-Smyth, (1997) Endocr. Rev. 18: 4-25, Shibuya *et al.*, (1999) Curr. Topics. Microbiol. Immunol. 237: 59-83, Plate *et al.*, (1994) Int. J. Cancer. 59: 520-9). VEGFR1 es el primer receptor de VEGF que se ha identificado (Shibuya *et al.*, (1990) Oncogene 5: 519-24), e interacciona con VEGF (VEGF-A) y con otros dos miembros de la familia de VEGF, VEGF-B (Olofsson *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2576-81) y el factor de crecimiento de placenta (PIGF) (Maglione *et al.*, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9267-71). Al desplazar a VEGF de VEGFR1, se espera que PIGF haga que más VEGF esté disponible para unirse y activar VEGFR2 y de esta manera aumentar la angiogénesis dirigida por VEGF (Park *et al.*, (1994) J. Biol. Chem. 269: 25646-54). Otros estudios han mostrado que existe una sinergia entre VEGF y PIGF *in vivo*, especialmente durante situaciones patológicas, como se evidencia por la tumorigénesis alterada y la fuga vascular en ratones PIGF -/- (Carmeliet *et al.*, (2001) Nat. Med. 7: 575-83).

45 Los documentos WO03/086450 y US2005/0175624 describen secuencias de oligonucleótidos y polipéptidos de moléculas que pertenecen a la familia del factor de permeabilidad vascular (VPF), sus receptores y correceptores y su modificación en inmunoterapia activa contra entidades patológicas cuyo curso se asocia con un aumento en la vasculatura. Dichos procedimientos se pueden usar, entre otros, en monoterapia o terapia combinada para el tratamiento de cáncer y su metástasis.

50 Los documentos WO2004/024766 y EP 1 548 032 describen nonapéptidos, decapéptidos y péptidos con inducibilidad de células T citotóxicas así como fármacos para el tratamiento o prevención de tumores, donde los fármacos comprenden estos péptidos.

55 Artículos recientes han mostrado que la vacunación usando ADNc o proteína recombinante de VEGFR2 de ratón se asocia con efectos antitumorales significativos en modelos tumorales de ratón (Li *et al.*, (2002) J. Exp. Med. 195: 1575-84, Niethammer *et al.*, (2002) Nat. Med. 8: 1369-75). Pero estos resultados no pueden garantizar directamente la aplicación clínica de esta estrategia, ya que usaron el homólogo de ratón de VEGFR2 humano en sistemas de ratón que se considera que son significativamente diferentes del equivalente humano.

60 Abreviaciones usadas en la presente solicitud:

65 LTC, linfocito T citotóxico

VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular

PIGF, factor de crecimiento de placenta

VEGFR1, receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR2, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

RTG, ratones transgénicos  
 AAT, antígeno asociado a tumores  
 i.d., inyección intradérmica  
 s.c., inyección subcutánea  
 5 IFA, adyuvante de Freund incompleto

**Breve compendio de la invención**

10 La presente invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

15 La presente divulgación proporciona péptidos que inducen células T citotóxicas contra células endoteliales que expresan endógenamente VEGFR1. Los péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13 o una secuencia en donde se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos. En ciertas formas de realización, el segundo aminoácido desde el extremo N es leucina o metionina. En algunas formas de realización, el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

20 También se divulan péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, o una secuencia en donde se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos. En ciertas formas de realización, el segundo aminoácido a partir del extremo N es fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano. En algunas formas de realización, el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina.

25 La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de tumores, en donde la composición comprende los péptidos de la divulgación.

25 También se divulan exosomas que presentan en su superficie un complejo que comprende el péptido de esta divulgación y un antígeno HLA. En algunas formas de realización, el antígeno HLA es HLA-A24 (por ejemplo, HLA A2402) o HLA-A02 (HLA-0201).

30 También se proporcionan métodos de inducir células presentadoras de antígeno que tienen alta inducibilidad de células T citotóxicas y métodos para inducir células T citotóxicas que comprenden administrar los péptidos de la divulgación a un paciente. En algunas formas de realización, los métodos pueden comprender transferir un gen que comprende un polinucleótido que codifica el péptido de la invención a células presentadoras de antígeno. La divulgación proporciona células T citotóxicas y células presentadoras de antígeno aisladas que son inducidas por los métodos de la divulgación. También se divulan células presentadoras de antígeno, que comprenden un complejo formado entre un antígeno HLA y el péptido de la divulgación.

40 También se divulan vacunas para inhibir la angiogénesis en un sitio enfermo, en donde la vacuna comprende el péptido de la divulgación como el principio activo. La vacuna de la divulgación se puede pretender para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A02. En algunas formas de realización, la vacuna se puede usar para suprimir el crecimiento de y/o metástasis de tumores malignos.

45 También se divulan métodos de tratamiento o prevención de tumores en un sujeto que comprenden la administración a dicho sujeto de una vacuna que comprende un péptido de la divulgación o un fragmento inmunológicamente activo o un polinucleótido que codifica el péptido.

50 También se divulan métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis en un sujeto que comprenden administrar una vacuna de la divulgación. En algunas formas de realización, la enfermedad mediada por angiogénesis es retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis o ateroesclerosis.

55 Se debe entender que tanto el anterior compendio de la invención como la siguiente descripción detallada son de una forma de realización preferida y no son restrictivas de la invención u otras formas de realización alternativas de la invención.

**55 Breve descripción de las figuras**

60 La figura 1 es un gráfico que muestra el establecimiento de clones de LTC restringidos a HLA-A\*0201 usando candidatos de epítopos derivados de VEGFR1. Citotoxicidad de cada clon de LTC contra células T2 pulsadas con cada péptido epítopo que se une a HLA-A\*0201. Se usaron células T2 para las respuestas de LTC en presencia o ausencia de cada péptido. Los clones de LTC mostraron citotoxicidades específicas contra las células diana pulsadas con los péptidos correspondientes. Relación E/D indica efector/célula diana.

65 La figura 2 es un gráfico que muestra el establecimiento de clones de LTC restringidos a HLA-A\*2402 usando candidatos de epítopos derivados de VEGFR1. Se usaron células A24-LCL para las respuestas de LTC restringidas a HLA-A\*2402 en presencia o ausencia de cada péptido que se une a HLA-A\*2402. Los clones de LTC mostraron

citotoxicidades específicas contra las células diana pulsadas con los péptidos correspondientes. Relación E/D indica efector/célula diana.

5 La figura 3 es un gráfico que muestra la citotoxicidad contra células que expresan endógenamente VEGFR1. Se examinó la citotoxicidad de clones de LTC HLA-A\*2402 contra células que expresan VEGFR1 (AG1-G1-Flt1) y control (AG1-G1) con un ensayo de 4 horas de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . Estos clones de LTC mostraron citotoxicidades contra AG1-G1-Flt1, pero no contra AG1-G1. Relación E/D indica efector/célula diana.

10 La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la respuesta de LTC *in vivo* asociada con la vacunación usando péptidos epítopos de VEGFR1 mediante ensayo ELISPOT de INF- $\gamma$ . Se inyectaron los péptidos conjugados a IFA por vía i.d. en RTG A2/Kb el día 0 y el día 11. El día 21, se usaron los esplenocitos de los ratones vacunados como células respondedoras, y se usaron células T2 pulsadas con o sin péptidos como células estimuladoras para el ensayo ELISPOT. Se observó la producción específica de IFN- $\gamma$  para el péptido correspondiente en los ratones vacunados con los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417. (Relación E/D: x20).

15 La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la inhibición *in vivo* de angiogénesis inducida por tumor. Las respuestas angiogénicas inducidas por células MC38 en RTG A2/Kb. Los ratones se vacunaron dos veces con HBSS, IFA solo y péptido de VEGFR1 conjugado con IFA (VEGFR1-1087, -770, -417). Las diferencias eran visibles macroscópicamente en las cámaras implantadas retiradas de la fascia s.c. de ratones vacunados. Cuantificación de 20 vasos recientes formados en la respuesta angiogénica. Se observó una inhibición significativa de la angiogénesis inducida por el tumor en los ratones vacunados con los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417. La barra de error indica el e.e.

25 La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del efecto antitumoral *in vivo*. Se inocularon i.d. RTG A2/Kb con células MCA205. Se vacunaron con HBSS, IFA solo y los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417 conjugados con IFA 4 días y 11 días después (la flecha indicada). Se observó supresión significativa del crecimiento tumoral con la vacunación usando los péptidos VEGFR1-1087, -770, conjugados con IFA.

#### Descripción detallada de la invención

30 Las palabras "un", "una", "el" y "la" como se usan en el presente documento significan "al menos uno" a menos que se indique específicamente de otra manera.

35 Se ha mostrado que la angiogénesis es un mecanismo crítico para la progresión tumoral. Estudios múltiples han sugerido que se puede suprimir el crecimiento tumoral si se puede inhibir la angiogénesis tumoral usando varios tipos de agentes antiangiogénicos. En la presente invención, examinamos la posibilidad de desarrollar una inmunoterapia nueva dirigida a VEGFR1. Primero identificamos los epítopos peptídicos de VEGFR1 de HLA-A2 y A24, y se establecieron con éxito clones de LTC con potente citotoxicidad contra células endoteliales que expresan endógenamente VEGFR1. En ratones transgénicos A2/Kb, la vacunación usando estos péptidos epítopos *in vivo* se 40 asoció con supresión significativa de crecimiento tumoral en un modelo terapéutico. En ensayos de antiangiogénesis, la angiogénesis inducida por tumores se suprimió significativamente con la vacunación. Estos resultados *in vitro* e *in vivo* sugieren firmemente que VEGFR1 podría ser una diana prometedora, y apoyan la razón fundamental definitiva del desarrollo clínico para inmunoterapia antiangiogénica contra varios tipos de cánceres.

45 En la presente invención, examinamos la eficacia de esta nueva inmunoterapia en sistemas estrechamente relacionados a marcos clínicos. Identificamos los péptidos epítopos de VEGFR1 humano restringidos a HLA-A\*0201 y A\*2402 (Rammensee *et al.*, 1995. Immunogenetics. 41: 178-228) y mostramos que los LTC inducidos por estos péptidos tienen citotoxicidad potente y específica contra no solo células diana pulsadas con los péptidos sino también células diana que expresan endógenamente VEGFR1 de una manera restringida por HLA de clase I. 50 Además, examinamos los efectos antitumorales *in vivo* de la vacunación con estos péptidos epítopos usando un modelo de ratón único que se puede trasladar directamente al marco clínico. Nuestro sistema modelo usa ratones transgénicos (RTG) A2/Kb, que se ha mostrado que son útiles para el análisis de epítopos de LTC humanos. Hay aproximadamente un 71% de concordancia entre los seres humanos y los RTG A2/Kb en el repertorio de LTC (Wentworth *et al.*, (1996) Eur. J. Immunol. 26: 97-101). Para construir sistemas tumorales, trasplantamos células 55 tumorales de ratón singénicas que se indujeron químicamente en ratones C57BL/6 (H-2Kb) que no expresan moléculas HLA-A\*0201. Este sistema tumoral, que combina RTG A2/Kb y la línea celular de ratón H-2Kb, ofrece un marco único. Puesto que las células endoteliales en los RTG A2/Kb expresan la molécula HLA-A\*0201, los LTC inducidos por la vacunación usando péptidos epítopos de VEGFR1 reconocen las células endoteliales que expresan tanto HLA-A\*0201 como VEGFR1. Por tanto, los efectos antitumorales *in vivo* de una vacuna antiangiogénica se 60 pueden evaluar de una manera restringida por HLA-A\*0201. Sin embargo, no reconocen células tumorales incluso si expresan VEGFR1 porque no expresan HLA-A\*0201. En este modelo tumoral *in vivo*, la vacunación usando estos péptidos epítopos se asoció con supresión significativa del crecimiento tumoral. En un ensayo antiangiogénesis, la angiogénesis inducida por tumor se suprimió significativamente con la vacunación usando estos péptidos epítopos. Estos resultados muestran que la vacunación usando péptidos epítopos derivados de VEGFR1 induce una 65 respuesta inmune antitumoral.

La identificación de antígenos asociados a tumores (AAT) ha permitido el desarrollo clínico de vacunas contra el cáncer basadas en péptidos, que podrían inducir LTC y lisar células tumorales de una manera restringida por HLA de clase I (Bruggen *et al.*, (1991) *Science*. 254: 1643-7, Boon *et al.*, (1996) *J. Exp. Med.* 183: 725-9, Rosenberg *et al.*, (1998) *Nat. Med.* 4: 321-7, Butterfield *et al.*, (1999) *Cancer Res.* 59: 3134-42). Múltiples ensayos clínicos usando

5 AAT han descrito que se observaron regresiones tumorales en pacientes de melanoma (Rosenberg *et al.*, (1998) *Nat. Med.* 4: 321-7, Nestle *et al.*, (1998) *Nat. Med.* 4: 328-32, Thurner *et al.*, (1999) *J. Exp. Med.* 190: 1669-78, Belli *et al.*, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20: 4169-80, Coulie *et al.*, (2002) *Immunol. Rev.* 188: 33-42). Se ha sugerido que la eficacia clínica se podría llevar a cabo por pérdida o disminución de moléculas de HLA de clase I en las células tumorales (Cormier *et al.*, (1998) *Int. J. Cancer*. 75: 517-24, Paschen *et al.*, (2003) *Int. J. Cancer*. 103: 759-67, 10 Fonteneau *et al.*, (1997) *J. Immunol.* 159: 2831-9, Reynolds *et al.*, (1998) *J. Immunol.* 161: 6970-6). Se ha estimado que la frecuencia de tumores que muestran alguna alteración en la expresión de moléculas de HLA de clase I es mayor del 40% (Cormier *et al.*, (1998) *Int. J. Cancer*. 75: 517-24, Paschen *et al.*, (2003) *Int. J. Cancer*. 103: 759-67). Por tanto, una parte significativa de las células tumorales podrían escapar de los LTC específicos al epítopo de clase I, incluso si los LTC se pudieran inducir con éxito por vacunas contra el cáncer que se dirigen a las células tumorales 15 mismas. El desarrollo de vacunas eficaces contra células endoteliales implicadas en la angiogénesis tumoral es un planteamiento alternativo. Las células endoteliales son genéticamente estables, no muestran disminución de moléculas de HLA de clase I, y están críticamente implicadas en la progresión de una variedad de tumores. Además, los LTC podrían causar directamente daño a las células endoteliales sin penetrar ningún otro tejido, y la lisis de incluso números bajos de células endoteliales en la vasculatura tumoral puede producir la destrucción de la 20 integridad de los vasos lo que produce la inhibición de grandes números de células tumorales (Folkman, J. (1995) *Nat. Med.* 1: 27-31). Por tanto, las células endoteliales son una buena diana para la inmunoterapia contra el cáncer. Para prevenir específica y eficazmente la angiogénesis tumoral con la respuesta de LTC, se necesita seleccionar la 25 diana apropiada entre las moléculas relacionadas con la angiogénesis.

VEGF se une a dos receptores tirosina quinasa relacionados, VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (KDR), que se expresan intensamente en células endoteliales en tejido tumoral pero no en tejido normal (Risau, W. (1997) *Nature*. 386: 671-4, Shibuya *et al.*, (1999) *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.* 237: 59-83, Plate *et al.*, (1994) *Int. J. Cancer*. 59: 520-9). La supresión de estos receptores mostró efectos antitumorales incluyendo anticuerpos neutralizantes, receptores recombinantes o inhibidores de quinasas (El-Mousawi *et al.*, (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 46681-91, Stefanik *et al.*, 30 (2001) *J. Neurooncol.* 55: 91-100, Wood *et al.*, (2000) *Cancer Res.* 60: 2178-89, Luttun *et al.*, (2002) *Nat. Med.* 8: 831-40, Lyden *et al.*, (2001) *Nat. Med.* 7: 1194-201, Lu *et al.*, (2001) *Cancer Res.* 61: 7002-8). Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR1 atenuaron eficazmente el crecimiento tumoral y la neovascularización de una manera dependiente de la dosis (Luttun *et al.*, (2002) *Nat. Med.* 8: 831-40). Además, el tratamiento de combinación con 35 reactivos que bloquean tanto VEGFR1 como VEGFR2 o el uso de un anticuerpo bifuncional ('diacuerpo') contra VEGFR1 y VEGFR2, como tales estrategias produjeron una inhibición más potente del crecimiento de vasos que la monoterapia con un único anticuerpo o con el anticuerpo parental monofuncional (Lyden *et al.*, (2001) *Nat. Med.* 7: 1194-201, Lu *et al.*, (2001) *Cancer Res.* 61: 7002-8).

40 En la presente divulgación usando nuestros nuevos sistemas modelos *in vitro* e *in vivo*, hemos demostrado que una inmunoterapia que se dirige a la angiogénesis inducida por tumor es eficaz. Al principio, identificamos los péptidos epítopos de VEGFR1 restringidos a HLA-A\*0201 y A\*2402 que son alelos de HLA reconocidos con frecuencia (Rammensee *et al.*, 1995. *Immunogenetics*. 41: 178-228). Los LTC se indujeron con éxito con estos péptidos, y 45 mostraron actividades citotóxicas potentes contra no solo células diana pulsadas con péptidos sino también células que expresan VEGFR1 endógenamente. Nuestros descubrimientos demostraron claramente que el VEGFR1 humano es inmunogénico en el sistema humano.

Después, demostramos efectos antitumorales *in vivo* usando múltiples líneas de células tumorales y RTG A2/Kb, un 50 buen sistema modelo para evaluar las respuestas inmunes en seres humanos contra células tumorales con la pérdida de expresión de HLA de clase I. Se ha mostrado que hay aproximadamente un 71% de concordancia entre el repertorio de LTC de seres humanos y RTG A2/Kb (Wentworth *et al.*, (1996) *Eur. J. Immunol.* 26: 97-101). Por tanto, los LTC inducidos por la vacunación usando péptidos epítopos pudieron reconocer células endoteliales, que derivan de RTG A2/Kb y expresan VEGFR1 y HLA-A\*0201, pero no reconocen las células tumorales que no tienen moléculas de MHC de clase I "humanas". Usando este sistema modelo de tumores único, se observó inhibición 55 significativa del crecimiento tumoral con la vacunación usando estos péptidos epítopos. Esta vacuna basada en péptidos también se asoció con supresión significativa de tumores antes de la vacunación. Estos resultados muestran que nuestra estrategia de vacunación es eficaz incluso para tumores con deficiencia en HLA, que se considera que es uno de los mecanismos de escape de tumores. También hemos mostrado en un ensayo DAS que la angiogénesis inducida por el tumor se inhibió significativamente con la vacunación usando estos péptidos epítopos. Este resultado muestra que la inhibición de angiogénesis tumoral se puede alcanzar con vacunación con 60 péptidos que se dirigen a la molécula expresa en células endoteliales vasculares inducidas por el tumor.

Estos resultados, *in vitro* e *in vivo*, muestran que VEGFR1 es una diana útil de terapia inmunológica que usa inmunidad celular y apoya la razón fundamental definitiva del desarrollo clínico de esta estrategia contra una amplia gama de cánceres.

Respecto a los antígenos HLA, los datos presentados aquí muestran que los usos del tipo A-24 o el tipo A-02 (que se dice que se expresan mucho entre los japoneses) son favorables para obtener resultados eficaces. Los usos de subtipos tales como A-2402 y A-0201 son incluso más preferibles. Sin embargo, en clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga de antemano, lo que permite la selección apropiada de péptidos que tienen niveles altos de afinidad de unión a este antígeno, o que tienen inducibilidad de células T citotóxicas (LTC) por presentación de antígenos. Además, para obtener péptidos que muestran alta afinidad de unión e inducibilidad de LTC, se puede llevar a cabo la sustitución o adición de 1, 2 o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial de VEGFR1 natural. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos, o preferiblemente 3 o menos. Asimismo, además de los péptidos que se muestran de forma natural, puesto que la regularidad de las secuencias de péptidos mostradas por la unión a antígenos HLA ya se conoce (Kubo RT, *et al.*, (1994) *J. Immunol.*, 152, 3913-24; Rammensee HG, *et al.*, (1995) *Immunogenetics*, 41:178-228; Kondo A, *et al.*, (1994) *J. Immunol.* 155:4307-12), se pueden realizar modificaciones basadas en tal regularidad en los péptidos obtenidos. Por ejemplo, los péptidos que muestran alta afinidad de unión a HLA-24 tienen su segundo aminoácido a partir del extremo N sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y los péptidos cuyo aminoácido en el extremo C se sustituye con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina también se pueden usar favorablemente. Por otro lado, los péptidos que muestran alta afinidad de unión a HLA-0201 tienen su segundo aminoácido a partir del extremo N sustituido con leucina o metionina, y los péptidos cuyo aminoácido C-terminal está sustituido con valina o leucina se pueden usar favorablemente. Además, se pueden añadir 1 o 2 aminoácidos al extremo N y/o al extremo C del péptido.

Sin embargo, cuando la secuencia peptídica es idéntica a una parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tienen una función diferente, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunes o síntomas alérgicos contra sustancias específicas, por tanto, preferiblemente, se evitan situaciones en que la secuencia coindice con la secuencia de aminoácidos de otra proteína realizando una búsqueda de homología usando las bases de datos disponibles. Además, si está claro de las búsquedas de homología que ni siquiera existen péptidos en los que 1 o 2 aminoácidos son diferentes, no hay peligro de que modificaciones de la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada para aumentar la afinidad de unión con antígenos HLA y/o aumentar la inducibilidad de LTC produzcan tales problemas.

Aunque se espera que péptidos que tienen alta afinidad de unión a los antígenos HLA como se describe anteriormente sean muy eficaces como vacunas contra el cáncer, los péptidos candidatos, que se seleccionan según la presencia de alta afinidad de unión como un indicador, se deben examinar para la presencia real de inducibilidad de LTC. La confirmación de la inducibilidad de LTC se logra mediante inducción de células presentadoras de antígeno que portan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) o más específicamente células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación con los péptidos, mezcla con células CD8 positivas, y después medida de la actividad citotóxica contra las células diana. Como el sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos que se han producido para que expresen un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en BenMohamed *et al.*, (2000) *Hum. Immunol.*, 61(8):764-79, artículos relacionados, libros, Linkout). Por ejemplo, las células diana se pueden radiomarcar con <sup>51</sup>Cr y similares, y se puede calcular la actividad citotóxica a partir de la radioactividad liberada de las células diana. De forma alternativa, se puede examinar midiendo el IFN-γ producido y liberado por los LTC en presencia de células presentadoras de antígeno que tienen péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ.

Como resultado de examinar la inducibilidad de LTC de los péptidos como se describe anteriormente, los que tienen alta afinidad de unión a un antígeno HLA no tenían necesariamente una inducibilidad alta. Además, nonapéptidos o decapéptidos seleccionados de péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos indicadas por VLLWEIFSL (SEQ ID NO: 1), TLFWLLLTL (SEQ ID NO: 2), NLTATLIVNV (SEQ ID NO: 13), SYGVLLWEIF (SEQ ID NO: 32) mostraron inducibilidad de LTC particularmente alta.

Además, la presente divulgación proporciona péptidos inmunogénicos de menos de aproximadamente 40 aminoácidos, con frecuencia menos de aproximadamente 20 aminoácidos, habitualmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos que tienen inducibilidad de células T citotóxicas, y que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 en la que se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos. En algunas formas de realización preferidas, el péptido inmunogénico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 10 aminoácidos indicados en SEQ ID NO: 32 en la que se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos pueden tener inducibilidad de LTC siempre que no coincida con la secuencia de aminoácidos de otras proteínas. En particular, la sustitución de aminoácidos a fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano en el segundo aminoácido a partir del extremo N, y a fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina en el aminoácido C-terminal, y la adición de aminoácidos de 1 o 2 aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C son ejemplos favorables. El experto en la materia reconocerá que además de las sustituciones y adiciones de aminoácidos, también se pueden usar fragmentos inmunológicamente activos de los péptidos en los métodos de la divulgación. Los métodos para determinar fragmentos activos se conocen bien en la técnica.

También se divultan péptidos que tienen inducibilidad de células T citotóxicas y comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 13, en la que se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos. La secuencia de

aminoácidos que comprende 9 o 10 aminoácidos indicada por SEQ ID NO: 1, 2 o 13, en la que se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos puede tener inducibilidad de LTC siempre que no coincida con la secuencia de aminoácidos de otras proteínas. En particular, la sustitución de aminoácido a leucina o metionina en el segundo aminoácido a partir del extremo N, y a valina o leucina en el aminoácido C-terminal, y la adición de aminoácidos de 1 o 2 aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C son ejemplos favorables. El experto en la materia reconocerá que además de sustituciones y adiciones de aminoácidos, también se pueden usar fragmentos inmunológicamente activos de los péptidos en los métodos de la invención. Los métodos para determinar fragmentos activos se conocen bien en la técnica. Los clones de LTC obtenidos por estimulación de estos péptidos modificados pueden reconocer los péptidos originales y producir daño.

El péptido de la invención y los péptidos divulgados en el presente documento se pueden preparar usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, por tecnología de ADN recombinante o síntesis química. El péptido de la invención se puede sintetizar de forma individual o como polipéptidos más largos que comprenden dos o más péptidos. El péptido puede estar aislado, es decir, sustancialmente libre de otras proteínas naturales de la célula huésped y fragmentos de las mismas.

Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos como se describe en el presente documento. Otras modificaciones incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que se pueden usar, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de los péptidos.

Los péptidos de esta divulgación se pueden preparar en una combinación, que comprende 1 o más péptidos de la divulgación para su uso como vacuna contra el cáncer que puede inducir LTC *in vivo* o *ex vivo*. Los péptidos pueden estar en una mezcla o se pueden conjugar entre sí usando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos se pueden expresar como una única secuencia polipeptídica. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de esta divulgación, los péptidos se pueden presentar a una densidad alta en los antígenos HLA de las células presentadoras de antígeno, después se inducen los LTC que específicamente reaccionan hacia el complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA y se induce una respuesta inmune fuerte contra las células vasculares endoteliales en las células tumorales. De forma alternativa, se pueden obtener células presentadoras de antígeno que tienen inmovilizados los péptidos de esta divulgación en su superficie celular retirando las células dendríticas de los sujetos, estas se estimulan *ex vivo* por los péptidos de esta divulgación, se inducen LTC en los sujetos mediante la readministración de estas células a los sujetos, y como resultado, se puede aumentar la agresividad hacia las células diana.

Más específicamente, la presente divulgación describe composiciones inmunogénicas para el tratamiento de tumores o prevención de la proliferación, metástasis, y similares, de tumores. Las composiciones comprenden 1 o más péptidos de esta divulgación. Los péptidos pueden ser iguales o diferentes en las composiciones. Además, la angiogénesis en el sitio patológico está estrechamente vinculada a tumores, así como a enfermedades tales como retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis y ateroesclerosis, y también a metástasis de tumores sólidos (Folkman, J., (1995) *Nature Med.* 1:27-31; Bicknell *et al.*, (1996) *Curr. Opin. Oncol.* 8:60-5). Por tanto, los péptidos descritos en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de tumores, enfermedad mediada por angiogénesis tal como retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis y ateroesclerosis, así como metástasis de tumores sólidos.

Se encontró que los péptidos de esta divulgación inhibían la formación de vasos sanguíneos tortuosos, que son morfológicamente diferentes de los vasos sanguíneos normales y se forman en tejidos tumorales malignos, y los resultados de analizar la cicatrización y fertilidad en ratones vacunados confirmó que no son efectos adversos en angiogénesis fisiológica normal. Además, cuando se probó la citotoxicidad contra células endoteliales no proliferativas o proliferativas *in vitro* usando clones de LTC que reconocen los péptidos descritos en el presente documento, se encontró que estos clones mostraban actividad más intensa hacia células endoteliales proliferativas que hacia células endoteliales no proliferativas. Más específicamente, funcionan muy específicamente hacia trastornos en los que se observan células endoteliales proliferativas y en particular cáncer.

Se puede realizar fácilmente la estimulación *in vivo* e *in vitro* de células dendríticas por los péptidos de esta divulgación exponiendo las células a una alta concentración de los péptidos de modo que estos péptidos se intercambian con péptidos que estaban originalmente inmovilizados en las células. Por tanto, los péptidos usados en esta divulgación deben tener al menos cierto nivel de afinidad de unión a antígenos HLA.

Los péptidos de esta divulgación se pueden administrar directamente o como una composición farmacéutica que se ha formulado por métodos convencionales de formulación. En tales casos, además de los péptidos de esta divulgación, se pueden incluir soportes, excipientes y similares que habitualmente se usan para fármacos según sea apropiado sin limitaciones particulares. Las composiciones inmunogénicas de esta divulgación se pueden usar para el tratamiento o prevención de varios tumores tales como cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata y tumor cerebral. Los péptidos de esta divulgación se dirigen a las células endoteliales de vasos sanguíneos que se forman de nuevo en tejidos tumorales y no se dirigen a las células

tumorales mismas, por tanto, una gran variedad de tumores se vuelven dianas de tratamiento, y no hay limitaciones particulares a su uso.

- 5 Las composiciones inmunogénicas para el tratamiento y/o prevención de tumores, que comprenden los péptidos de esta divulgación como los principios activos, se pueden administrar con un adyuvante de modo que se establezca eficazmente la inmunidad celular, o se pueden administrar con otros principios activos tales como agentes antitumorales, y se pueden administrar mediante formulación en gránulos. Un adyuvante que se puede aplicar incluye los descritos en la bibliografía (Johnson AG. (1994) *Clin. Microbiol. Rev.*, 7:277-89). Los adyuvantes ejemplares incluyen, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre. Además, se pueden usar convenientemente formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las que el fármaco está unido a bolas de unos pocos  $\mu\text{m}$ , y formulaciones en las que un lípido se une al fármaco. El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, inyección intravenosa, o similares, y es posible la administración sistémica o la administración local en la vecindad del tumor diana. La dosis de los péptidos de esta divulgación se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se va a tratar, la edad del paciente, peso, método de administración, y similares, y es habitualmente de 0,001 mg a 1000 mg, preferiblemente de 0,01 mg a 100 mg, más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg, y preferiblemente se administra una vez en unos pocos días a unos pocos meses. El experto en la materia puede seleccionar de forma apropiada la dosis adecuada.
- 10 20 De forma alternativa, también se divultan vesículas llamadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y antígenos HLA en su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos descritos en detalle en la traducción japonesa publicada de las publicaciones internacionales No. Hei 11-510507 y 2000-512161, y preferiblemente se preparan usando células presentadoras de antígenos obtenidas de sujetos que son dianas de tratamiento y/o prevención. Los exosomas de esta invención se pueden inocular como vacunas contra el cáncer, de forma similar a los péptidos de esta invención.
- 15 25 30 El tipo de antígenos HLA usado debe coincidir con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, para un japonés HLA-A24 o HLA-A02, particularmente HLA-A2402 o HLA-A0201 pueden ser apropiados.
- 35 En algunas formas de realización, las composiciones de la divulgación comprenden un componente que sensibiliza linfocitos T citotóxicos. Se han identificado lípidos como agentes capaces de sensibilizar LTC *in vivo* contra agentes víricos. Por ejemplo, se pueden unir residuos de ácido palmítico a los grupos  $\epsilon$ - y  $\alpha$ -amino de un residuo de lisina y después unirse a un péptido inmunogénico de la invención. El péptido lipido se puede administrar después directamente en una micela o partícula, incorporado en un liposoma, o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de sensibilización lipídica de respuestas de LTC, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P3CSS), para sensibilizar LTC cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres, *et al.*, (1989) *Nature* 342:561-4).
- 40 45 Las composiciones inmunogénicas de la divulgación también pueden comprender ácidos nucleicos que codifican los péptidos inmunogénicos divulgados aquí. Véase, por ejemplo, Wolff *et al.*, (1990) *Science* 247:1465-8; las patentes en EE UU Nos. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y el documento WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de administración basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por péptidos), complejos lipídicos catiónicos y administración mediada por partículas ("bombardeo de genes") o mediada por presión (véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 5.922.687).
- 50 55 Los péptidos inmunogénicos de la divulgación también se pueden expresar mediante vectores víricos o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen huéspedes víricos atenuados, tales como vaccinia o viruela aviar. Este planteamiento implica el uso del virus vaccinia, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Tras la introducción en un huésped, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido inmunogénico y de esta manera provoca una respuesta inmune. Se describen vectores vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización en, por ejemplo, la patente en EE UU No. 4.722.848. Otro vector es BCG (Bacilo Calmette Guerin). Los vectores BCG se describen en Stover, *et al.*, (1991) *Nature* 351:456-60. Serán aparentes una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o inmunización, por ejemplo, vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores *Salmonella typhi* o vectores de la toxina del carbunclo detoxificado. Véase, por ejemplo, Shata, *et al.*, (2000) *Mol. Med. Today* 6:66-71; Shedlock, *et al.*, (2000) *J. Leukoc. Biol.* 68:793-806; y Hipp, *et al.*, (2000) *In vivo* 14:571-85.
- 60 65 La presente divulgación también proporciona métodos de inducir células presentadoras de antígeno usando los péptidos de esta divulgación. Las células presentadoras de antígeno se pueden inducir mediante inducción de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica y después poniéndolas en contacto (estimulándolas) con los péptidos descritos de esta divulgación *in vitro* o *in vivo*. Cuando los péptidos de esta divulgación se administran a los sujetos, se inducen en el cuerpo del sujeto células presentadoras de antígeno que tienen los péptidos descritos en el presente documento inmovilizados en ellas. De forma alternativa, después de inmovilizar los péptidos de esta divulgación a las células presentadoras de antígeno, las células se pueden administrar al sujeto como una vacuna.

Esta divulgación también proporciona un método para inducir células presentadoras de antígeno que tienen un nivel alto de inducibilidad de células T citotóxicas, en el que el método comprende el paso de transferir genes que comprenden polinucleótidos que codifican los péptidos de esta divulgación a células presentadoras de antígeno *in vitro*. Los genes introducidos pueden estar en forma de ADN o ARN. Para el método de introducción, sin limitaciones particulares, se pueden usar varios métodos convencionalmente realizados en este campo, tales como lipofección, electroporación y método del fosfato de calcio. Más específicamente, se puede realizar como se describe en Reeves ME, *et al.*, (1996) *Cancer Res.*, 56:5672-7; Butterfield LH, *et al.*, (1998) *J. Immunol.*, 161:5607-13; Boczkowski D, *et al.*, (1996) *J. Exp. Med.*, 184:465-72; traducción japonesa publicada de la publicación internacional No. 2000-509281. Al transferir el gen a las células presentadoras de antígeno, el gen experimenta transcripción, traducción y similar, en la célula, y después la proteína obtenida se procesa y une a MHC de clase I o clase II, y sigue a través de una vía de presentación para presentar péptidos parciales.

Además, la presente divulgación proporciona métodos para inducir LTC usando los péptidos de esta invención. Cuando los péptidos de esta invención se administran a un sujeto, se inducen LTC en el cuerpo del sujeto, y la fuerza del sistema inmunitario que se dirige a las células endoteliales angiogénicas en los tejidos tumorales aumenta. De forma alternativa, se pueden usar para un método terapéutico *ex vivo*, en el que se ponen en contacto (estimulan) células presentadoras de antígeno derivadas del sujeto y células CD8 positivas o leucocitos mononucleares de sangre periférica con los péptidos descritos en el presente documento *in vitro*, y después de inducir los LTC, las células se devuelven al sujeto.

Además, la presente divulgación proporciona células T citotóxicas aisladas que se inducen usando los péptidos de esta divulgación. Las células T citotóxicas, que se han inducido mediante estimulación de células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos de esta divulgación, preferiblemente derivan de los sujetos que son dianas de tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar por ellas mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de esta divulgación o exosomas para el fin de efectos antitumorales. Las células T citotóxicas obtenidas actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de esta divulgación o preferiblemente los mismos péptidos usados para la inducción. Las células diana pueden ser células que expresan VEGFR1 endógenamente o células que se transfecan con un gen que codifica VEGFR1, y las células que presentan los péptidos de esta divulgación en la superficie celular debido a la estimulación por estos péptidos también se pueden convertir en dianas de ataque.

La presente divulgación también proporciona células presentadoras de antígeno que comprenden la presentación de complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de esta invención. Las células presentadoras de antígeno que se obtienen poniendo en contacto los péptidos de esta divulgación o los nucleótidos que codifican los péptidos de esta invención preferiblemente derivan de los sujetos que son dianas del tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por ellas mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de esta divulgación, exosomas o células T citotóxicas.

En la presente divulgación, la frase "vacuna" (también denominada una composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad contra células endoteliales tumorales para suprimir tumores tras la inoculación en animales. Según la presente divulgación se sugirió que los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13 eran péptidos epítopos restringidos a HLA-A02 y se sugirió que SEQ ID NO: 32 era un péptido epítopo restringido a HLA-A24 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica contra células endoteliales tumorales que expresan VEGFR1. Por tanto, la presente divulgación también abarca un método de inducción de inmunidad antitumoral usando polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13, 32. En general, la inmunidad antitumoral incluye respuestas inmunitarias tales como las siguientes:

- inducción de linfocitos citotóxicos contra células endoteliales en tumores;
- inducción de anticuerpos que reconocen células endoteliales en tumores, e
- inducción de la producción de citoquinas antitumorales.

Por tanto, cuando una cierta proteína induce cualquiera de estas respuestas inmunitarias tras la inoculación en un animal, se decide que la proteína tiene efecto inductor de inmunidad antitumoral. La inducción de la inmunidad antitumoral por una proteína se puede detectar observando *in vivo* o *in vitro* la respuesta del sistema inmunitario en el huésped contra la proteína.

Por ejemplo, se conoce bien un método para detectar la inducción de linfocitos T citotóxicos. Una sustancia exógena que entra el cuerpo vivo se presenta a células T y células B mediante la acción de las células presentadoras de antígeno (CPA). Las células T que responden al antígeno presentado por las CPA de una manera específica de antígeno se diferencian a células T citotóxicas (o linfocitos T citotóxicos; LTC) debido a la estimulación por el antígeno y después proliferan (esto se denomina activación de células T). Por tanto, la inducción de LTC por un cierto péptido se puede evaluar presentando el péptido a una célula T por CPA, y detectando la inducción de LTC. Además, las CPA tienen el efecto de activar células T CD4+, células T CD8+, macrófagos, eosinófilos y células NK. Puesto que las células T CD4+ también son importantes en inmunidad antitumoral, la acción inductora de inmunidad antitumoral del péptido se puede evaluar usando el efecto de activación de estas células como indicadores.

En la técnica se conoce bien un método para evaluar la acción inductora de LTC usando células dendríticas (CD) como CPA. La CD es una CPA representativa que tiene la acción inductora de LTC más fuerte entre las CPA. En este método, el polipéptido de prueba inicialmente se pone en contacto con la CD y después esta CD se pone en contacto con células T. La detección de células T que tienen efectos citotóxicos contra las células de interés después del contacto con las CD muestra que el polipéptido de prueba tiene una actividad de inducción de células T citotóxicas. La actividad de LTC contra tumores se puede detectar, por ejemplo, usando la lisis de células tumorales marcadas con <sup>51</sup>Cr como el indicador. De forma alternativa, también se conoce bien el método de evaluar el grado de daño de células tumorales usando la actividad de captación de <sup>3</sup>H-timidina o liberación de LDH (lactosa deshidrogenasa) como el indicador.

A parte de las CD, también se pueden usar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como CPA. Se describe que la inducción de LTC aumenta al cultivar PBMC en presencia de GM-CSF e IL-4. De forma similar, se ha mostrado que los LTC se inducen al cultivar PBMC en presencia de hemocianina de lapa californiana (KLH) e IL-7.

Los polipéptidos de prueba confirmados que poseen actividad inductora de LTC por estos métodos son polipéptidos que tienen efecto de activación de CD y posterior actividad inductora de LTC. Por tanto, los polipéptidos que inducen LTC contra células endoteliales tumorales son útiles como vacunas contra tumores. Además, las CPA que adquirieron la capacidad de inducir LTC contra células endoteliales tumorales poniéndolas en contacto con los polipéptidos son útiles como vacunas contra tumores. Además, los LTC que adquirieron citotoxicidad debido a la presentación de los antígenos del polipéptido por las CPA también se pueden usar como vacunas contra tumores. Tales métodos terapéuticos para tumores que usan inmunidad antitumoral debido a CPA y LTC se denominan inmunoterapia celular.

En general, cuando se usa un polipéptido para inmunoterapia celular, se sabe que la eficacia de la inducción de LTC aumenta al combinar una pluralidad de polipéptidos que tienen diferentes estructuras y poniéndolos en contacto con CD. Por tanto, cuando se estimulan CD con fragmentos de proteínas, es ventajoso usar una mezcla de múltiples tipos de fragmentos.

De forma alternativa, la inducción de inmunidad antitumoral por un polipéptido se puede confirmar observando la inducción de la producción de anticuerpos contra tumores. Por ejemplo, cuando se inducen anticuerpos contra un polipéptido en un animal de laboratorio inmunizado con el polipéptido, y cuando esos anticuerpos suprimen el crecimiento, proliferación o metástasis de células tumorales, se puede determinar que el polipéptido tiene una capacidad de inducir inmunidad antitumoral.

También se divulga un método de tratamiento o prevención de tumores en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una vacuna que comprende un polipéptido codificado por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en VEGFR1 o un fragmento inmunológicamente activo de dicho polipéptido, o un polinucleótido que codifica el polipéptido o el fragmento del mismo. La administración del polipéptido induce inmunidad antitumoral en un sujeto. Por tanto, la presente divulgación proporciona además un método para inducir inmunidad antitumoral. El polipéptido o los fragmentos inmunológicamente activos del mismo pueden ser útiles como vacunas contra tumores. En algunos casos las proteínas o fragmentos de las mismas se pueden administrar en una forma unidas al receptor de células T (TCR) o presentadas en una célula presentadora de antígeno (CPA), tal como un macrófago, célula dendrítica (CD) o células B. Debido a la fuerte capacidad presentadora de antígenos de las CD, el uso de CD es el más preferible entre las CPA.

La inmunidad antitumoral se induce administrando la vacuna de esta divulgación y la inducción de inmunidad antitumoral permite el tratamiento y prevención de tumores. La terapia contra o la prevención del inicio de tumores incluye cualquiera de los pasos, tales como inhibición del crecimiento de células tumorales, involución de células tumorales y supresión de la aparición de células tumorales. El descenso en la mortalidad de individuos que tienen tumores, el descenso de marcadores tumorales en la sangre, el alivio de los síntomas detectables que acompañan a los tumores y similares también se incluyen en la terapia o prevención de tumores. Tales efectos terapéuticos y preventivos preferiblemente son estadísticamente significativos. Por ejemplo, en observación, a un nivel de significancia del 5% o menos, en donde el efecto terapéutico o preventivo de una vacuna contra tumores se compara a un control sin la administración de la vacuna. Por ejemplo, se pueden usar la prueba de la t de Student, la prueba U de Mann-Whitney o ANOVA para los análisis estadísticos.

La proteína mencionada anteriormente que tiene actividad inmunológica, o un polinucleótido o vector que codifica la proteína se puede combinar con un adyuvante. Un adyuvante se refiere a un compuesto que aumenta la respuesta inmune contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los ejemplos de adyuvantes incluyen toxina del cólera, toxina de salmonella, alumbre y similares, pero no están limitados a los mismos. Además, la vacuna de esta divulgación se puede combinar de forma apropiada con un soporte farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales soportes son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, la vacuna puede contener según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. La vacuna se administra

sistémica o localmente. La administración de la vacuna se puede llevar a cabo por un única administración o estimulada por múltiples administraciones.

5 Cuando se usan CPA o LTC como la vacuna de esta divulgación, los tumores se pueden tratar o prevenir, por ejemplo, mediante el método *ex vivo*. Más específicamente, se recogen PBMC del sujeto que recibe el tratamiento o prevención, las células se ponen en contacto con el polipéptido *ex vivo*, y después de la inducción de CPA o LTC, las células se pueden administrar al sujeto. También se pueden inducir las CPA introduciendo un vector que codifica el polipéptidos en las PBMC *ex vivo*. Las CPA o LTC inducidos *in vitro* se pueden clonar antes de la administración. Al clonar y hacer crecer células que tienen alta actividad de dañar células diana, la inmunoterapia celular se puede 10 realizar de forma más eficaz. Además, las CPA y LTC aislados de esta manera se pueden usar para inmunoterapia celular no solo contra individuos de los que derivan las células, sino también contra tipos similares de enfermedades en otros individuos.

15 A menos que se definan de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la materia a la que pertenece esta invención.

### Ejemplos

20 La presente invención se ilustra en detalle mediante los siguientes ejemplos, pero no está restringida a estos ejemplos.

### Materiales y Métodos

#### Líneas celulares

25 La línea celular T2 fue generosamente suministrada por el Dr. H. Shiku (Escuela de Medicina de la Universidad de Mie). Las líneas celulares AG1-G1-Flt-1 y AG1-G1-Neo fueron amablemente suministradas por el Dr. M. Shibuya (Instituto de Ciencia Médica, Universidad de Tokio). La línea celular AG1-G1 se estableció de hemangioma benigno humano, y se generó AG1-G1-Flt-1 infectando las líneas celulares AG1-G1 con el vector plásmido BCMGS que lleva 30 el ADNc de VEGFR1. MCA205, una línea celular de fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno, fue un generoso regalo del Dr. S.A. Rosenberg (Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD). B16, un melanoma murino, y MC38, un adenocarcinoma de colon murino, se compraron de la ATCC.

#### Péptidos sintéticos

35 Los candidatos de péptidos epítopos derivados de VEGFR1 restringidos a HLA-A\*0201 (A2) y -A\*2402 (A24) se seleccionaron basándose en las afinidades de unión de los HLA correspondientes. Las afinidades de unión se predijeron con el sitio web de Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) (Kuzushima *et al.*, (2003) Blood. 101: 1460-8, Parker *et al.*, (1994) J. Immunol. 152: 163-75). Estos péptidos candidatos fueron sintetizados por 40 Sawady Techonology, Japón según el método estándar de síntesis en fase sólida, y purificados por HPLC de fase reversa. La pureza (>95%) y la identidad de los péptidos se determinó por HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos usados en la presente invención se enumeran en la tabla 1 y 2.

45 El péptido CEA (DVLYGPDTPI (SEQ ID NO: 41)) se usó como control positivo para un modelo de ratón *in vivo*. Los péptidos de CMV (A02; NLVPMVATV (SEQ ID NO: 42), A24; QYDPVAALF (SEQ ID NO: 43)) se usaron como controles positivos para la inducción de LTC humanos *in vitro* (Solache *et al.*, (1999) J. Immunol. 163: 5512-8, Kuzushima *et al.*, (2001) Blood. 98: 1872-81).

#### Animales

50 Los RTG A2/Kb, cuyo MHC de clase I consiste en dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de HLA-A\*0201 y el dominio  $\alpha 3$  de H-2Kb de ratón, se prepararon como se describe en otro lugar (Wentworth *et al.*, (1996) Eur. J. Immunol. 26: 97-101). Los animales se mantuvieron en el animalario sin patógenos específicos del Instituto de Ciencia Médica, Universidad de Tokio, y todos los protocolos para experimentos animales fueron aprobados por el comité ético del instituto.

#### Generación de líneas y clones de LTC

55 Se usaron células dendríticas (CD) derivadas de monocitos para inducir respuestas de LTC contra péptidos presentados en HLA como se ha descrito previamente (Nukaya *et al.*, (1999) Int. J. Cancer. 80: 92-7, Tsai *et al.*, (1997) J. Immunol. 158: 1796-802, Nakahara *et al.*, (2003) Cancer Res. 63: 4112-8). Brevemente, se obtuvieron PBMC de voluntarios sanos con HLA correspondientes y se cultivaron en presencia de GM-CSF (suministrado por Kirin Brewery Company, Japón) e IL-4 (Genzyme/Techne, Minneapolis). Despues de cultivar durante 5 días, se añadió al cultivo OK-432 (Chugai Pharmaceutical Corporation, Japón) para obtener CD maduras (Nakahara *et al.*, (2003) Cancer Res. 63: 4112-8). El día 7, las CD maduras generadas se pulsaron con cada péptido para la estimulación de células T. Usando estas CD pulsadas con péptidos cada vez, se estimularon las células T CD8+

autólogas durante tres veces los días 0, 7 y 14, y después se probaron las actividades citotóxicas de las células linfoides resultantes el día 21.

5 Para generar clones de LTC, las líneas de LTC establecidas se sembraron en placas de 96 pocillos a 0,3, 1 y 3 células por pocillo con PBMC alógenas y A3-LCL como células estimuladoras. Se probaron las actividades citotóxicas de los clones de LTC resultantes el día 14.

#### Ensayo de citotoxicidad

10 Se midieron las actividades citotóxicas usando un ensayo estándar de 4 horas de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . Se usaron células T2 y A24-LCL como células diana pulsadas con péptidos candidatos. Se calculó el porcentaje de lisis específica como sigue:

$$15 \text{ % de lisis específica} = \frac{(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea})}{(\text{liberación máxima-liberación espontánea})} \times 100$$

#### Inmunogenicidad de péptidos epítopos en RTG A2/Kb

20 Para la sensibilización de los LTC específicos de péptido, se dio inmunización usando 200  $\mu\text{l}$  de mezcla de vacuna, que contiene 100  $\mu\text{g}$  de un péptido restringido a HLA-A2 y 100  $\mu\text{l}$  de IFA por ratón. La vacuna se inyectó por vía intradérmica en el flanco derecho para la primera inmunización el día 0 y en el otro flanco para la segunda el día 11. El día 21, se usaron los esplenocitos de los ratones vacunados como las células respondedoras, y se usaron células T2 pulsadas con o sin péptidos como las células estimuladoras para el ensayo ELISPOT.

#### 25 Ensayo de angiogénesis *in vivo*

30 Examinamos los efectos de la vacunación con péptidos usando el ensayo de saco aéreo dorsal (DAS) que se diseñó para medir la angiogénesis *in vivo* inducida por células tumorales como se ha descrito previamente (Oikawa *et al.*, (1997) Anticancer Res.17: 1881-6). Brevemente, se vacunaron los RTG A2/Kb dos veces con un intervalo de 1 semana en el flanco izquierdo usando los péptidos correspondientes conjugados con IFA como se ha descrito previamente con alguna modificación (Schuler *et al.*, (1997) J. Exp. Med. 186: 1183-7, Song *et al.*, (1997) J. Exp. Med. 186: 1247-56, Specht *et al.*, (1997) J. Exp. Med. 186: 1213-21). Se llenó una cámara Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA) con PBS que contenía células MC38 ( $1 \times 10^6$  células) y se implantó en el dorso de ratones anestesiados el día 0. Las cámaras implantadas se retiraron de la fascia s.c. el día 6 y después se colocaron anillos negros en los sitios expuestos a un contacto directo con la cámara. Se evaluó la respuesta angiogénica con fotografías tomadas usando un microscopio de disección. El grado de angiogénesis se determinó con el número de vasos sanguíneos recién formados de  $>3$  mm de longitud y se puntuó de forma semicuantitativa usando un índice que variaba desde 0 (ninguno) hasta 5 (muchos).

#### 40 Efectos antitumorales *in vivo*

45 Examinamos los efectos antitumorales de esta vacunación con un modelo terapéutico. Se inyectaron i.d. las  $1 \times 10^5$  células MCA205 o las  $5 \times 10^5$  células B16 en el flanco derecho el día 0, y la vacunación se realizó el día 4 y el día 14 usando los correspondientes péptidos conjugados con IFA.

#### Análisis estadístico

50 Cada experimento se realizó en triplicado para confirmar la reproducibilidad de los resultados, y se muestran resultados representativos. Se usó la prueba de la t de Student para examinar la significación de los datos, cuando fue aplicable. La diferencia se consideró que era estadísticamente significativa cuando el valor de P era menor de 0,05.

#### **Resultados**

##### 55 Péptidos que se predice se unen a HLA de clase I de la proteína VEGFR1

60 Los candidatos de los péptidos epítopos derivados de VEGFR1 restringidos a HLA-A\*0201 (A2) y -A\*2402 (A24) se seleccionaron basándose en las afinidades de unión a los correspondientes HLA. Las afinidades de unión se predijeron con el sitio web de Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS).

65 Software de predicción de unión de péptidos a HLA:  
 $(\text{http://bimas.dcr.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform})$   
 Kuzushima, K. *et al.*, (2003) Blood. 101: 1460-8.  
 Parker, K.C. *et al.*, (1994) J. Immunol. 152: 163-75).

##### 65 Establecimiento de clones de LTC usando candidatos epítopos derivados de VEGFR1

Primero probamos la inmunogenicidad de VEGFR1 para determinar los péptidos epítopos. Los péptidos epítopos candidatos se seleccionaron en el orden de las puntuaciones de unión que reflejan la afinidad de unión del péptidos a las molécula de HLA de clase I (tabla 1, tabla 2).

5

Tabla 1. Péptidos de unión predicha a HLA-A\*0201 de la proteína VEGFR1

Posición inicial	Secuencia (9-mero)	SEQ ID NO.	Afinidad de unión	Posición inicial	Secuencia (10-mero)	SEQ ID NO.	Afinidad de unión
1087	VLLWEIFSL	1	1793	1153	KLGDLLQANV	11	998
770	TLFWLLLTL	2	182	1029	LLSENNVVVKI	12	167
1028	ILLSENNVV	3	179	417	NLTATLIVNV	13	160
766	CVAATLFWL	4	137	1094	SLGGSPYPGV	14	104
874	ALMTELKIL	5	75	1104	QMDEDFCCSR	15	96
861	KMLKEGATA	6	47	1086	GVLLWEIFSL	16	92
875	LMTELKILT	7	38	797	IIMDPDEVPL	17	76
881	ILTHIGHHL	8	36	1004	FQVARGMEFL	18	62
1027	NILLSENNV	9	35	220	YLTHRQTNTI	19	48
220	YLTHRQTNT	10	34	590	ILLRTVNNRT	20	47

Tabla 2. Péptidos de unión predicha a HLA-A\*2402 de la proteína VEGFR1

10

Posición inicial	Secuencia (9-mero)	SEQ ID NO.	Afinidad de unión	Posición inicial	Secuencia (10-mero)	SEQ ID NO.	Afinidad de unión
913	KYGNLNSYL	21	576	919	NYLKSKRDLF	31	150
919	NYLKSKRDL	22	300	1084	SYGVLLLWEIF	32	120
871	EYKALMTEL	23	264	1001	SYSFQVARGM	33	35
1212	RYVNAFKFM	24	90	880	KILTHIGHHL	34	17
1084	SYGVLLWEI	25	66	1003	SFQVARGMEF	35	17
1146	RFAELVEKL	26	64	1212	RYVNAFKFMS	36	15
821	EFARERLKL	27	22	700	KIQQEPGII	37	12
754	KSNLELITL	28	12	873	KALMTELKIL	38	12
819	KWEFARERL	29	12	1149	ELVEKLGDLL	39	9
814	PYDASKWEF	30	11	1079	KSDVWSYGV	40	8

Generamos LTC usando estos péptidos y PBMC dadas de voluntarios sanos con HLA-A\*0201 y HLA-A\*2402 como se describe en "Materiales y Métodos", y se establecieron con éxito clones de LTC.

15 Estos clones de LTC mostraron citotoxicidad específica contra las células diana pulsadas con los péptidos correspondientes (figura 1, figura 2).

También examinamos la capacidad de los clones de LTC establecidos inducidos con estos péptidos para lisar las células diana que también expresan endógenamente VEGFR1.

20

Se examinó la citotoxicidad del clon de LTC HLA-A\*2402 contra células que expresan VEGFR1 (AG1-G1-Flt-1) y control (AG1-G1) en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr de 4 horas. Estos clones de LTC mostraron las citotoxicidades contra AG1-G1-Flt-1 pero no contra AG1-G1 (figura 3). La citotoxicidad se bloqueó significativamente con Acm contra CD8 y HLA de clase I, pero no se bloqueó usando Acm contra CD4 ni HLA de clase II (datos no mostrados).

25

#### Efectos antiangiogénesis y antitumorales *in vivo* asociados con la vacunación usando péptidos epítopos de VEGFR1

30 Probamos los efectos antiangiogénesis y los efectos antitumorales *in vivo* de la vacunación con péptidos epítopos de VEGFR1 usando RTG A2/Kb.

30

Al principio, evaluamos la inmunogenicidad de los péptidos epítopos para RTG A2/Kb para examinar la producción específica de IFN-γ de los LTC inducidos con estos péptidos mediante ensayo ELISPOT (figura 4). Se inyectó s.c. el péptido conjugado con IFA en RTG A2/Kb el día 0 y el día 11. El día 21, se recogieron los esplenocitos de los ratones vacunados y se usaron como células respondedoras, y se usaron células T2 pulsadas con o sin péptidos como las células estimuladoras para el ensayo ELISPOT. Se observó la producción específica de IFN-γ para el péptido correspondiente en los ratones vacunados con los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417. En este ensayo ELISPOT usando el sistema de RTG A2/Kb, se mostraron resultados positivos para los péptidos epítopos identificados usando PBMC humanas.

40

Examinamos si la vacunación usando péptidos derivados de VEGFR1 suprimía la angiogénesis inducida por tumor. Para confirmar los efectos de la vacunación con péptidos sobre la angiogénesis inducida por las células tumorales,

empleamos un ensayo de saco aéreo dorsal (ensayo DAS) que visualiza el grado de neovascularización *in vivo*. En este ensayo semicuantitativo, se observó una inhibición significativa de la angiogénesis en los ratones vacunados con los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417 (figura 5).

5 La vacunación usando el péptido epítopo mostró un fuerte efecto antitumoral en el modelo terapéutico. Se inyectaron i.d. MCA205, una línea de células de fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno, en RTG A2/Kb el día 0, y la vacunación se realizó en estos ratones 4 y 14 días después de la exposición tumoral usando los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417 conjugados con IFA (figura 6). Se observó supresión significativa del crecimiento tumoral con la vacunación usando los péptidos VEGFR1-1087, -770 conjugados con IFA. Además, se observaron inhibiciones 10 significativas de crecimiento tumoral en varias células tumorales (datos no mostrados).

15 Estos resultados sugieren firmemente que los efectos antitumorales inducidos con la vacunación usando los péptidos derivados de VEGFR1 podrían estar mediados por la inhibición de la angiogénesis tumoral. Por tanto, la vacunación con péptidos epítopos derivados de VEGFR1 podría afectar al crecimiento de las células tumorales a través de los efectos sobre las células endoteliales que expresan VEGFR1 de los vasos que apoyan el crecimiento tumoral *in vivo* en este sistema de tumores en RTG A2/Kb.

## Discusión

20 La identificación de antígenos asociados a tumores (AAT) ha permitido el desarrollo clínico de vacunas contra el cáncer basadas en péptidos, que podrían inducir LTC y lisar células tumorales de una manera restringida por HLA de clase I (Bruggen *et al.*, (1991) *Science*. 254: 1643-7, Boon *et al.*, (1996) *J. Exp. Med.* 183: 725-9, Rosenberg *et al.*, (1998) *Nat. Med.* 4: 321-7, Butterfield *et al.*, (1999) *Cancer Res.* 59: 3134-42). Hasta ahora, múltiples ensayos 25 clínicos usando péptidos de AAT han descrito que se observaron regresiones tumorales en aproximadamente un índice del 20% en pacientes de melanoma. Sin embargo, la respuesta completa raramente se ha descrito (Rosenberg *et al.*, (1998) *Nat. Med.* 4: 321-7, Nestle *et al.*, (1998) *Nat. Med.* 4: 328-32, Thurner *et al.*, (1999) *J. Exp. Med.* 190: 1669-78, Belli *et al.*, (2002) *Parmiani. J. Clin. Oncol.* 20: 4169-80, Coulie *et al.*, (2002) *Immunol. Rev.* 188: 33-42). Una de las posibles razones para la modesta eficacia clínica podría ser la pérdida o disminución de las 30 moléculas de HLA de clase I en las células tumorales (Cormier *et al.*, (1998) *Int. J. Cancer*. 75: 517-24, Paschen *et al.*, (2003) *Int. J. Cancer*. 103: 759-67, Fonteneau *et al.*, (1997) *J. Immunol.* 159: 2831-9, Reynolds *et al.*, (1998) *J. Immunol.* 161: 6970-6). Se ha estimado que la frecuencia de tumores que muestran alguna alteración en la expresión de moléculas de HLA de clase I es de más del 40% (Cormier *et al.*, (1998) *Int. J. Cancer*. 75: 517-24, Paschen *et al.*, (2003) *Int. J. Cancer*. 103: 759-67). Por tanto, una parte significativa de las células tumorales podría 35 escapar de los LTC específicos para el epítopo de clase I, incluso si los LTC se pudieran inducir con éxito por vacunas contra el cáncer que se dirigen a las células tumorales mismas. Estos problemas se pueden salvar con el desarrollo de vacunas eficaces contra la angiogénesis tumoral, ya que las células endoteliales son genéticamente estables, no muestran disminución de moléculas de HLA de clase I y están críticamente implicadas en la progresión de una variedad de tumores. Además, los LTC podrían causar daño directamente a las células endoteliales sin penetrar en ningún otro tejido, y la lisis de incluso números bajos de células endoteliales en la vasculatura del tumor 40 produciría la destrucción de la integridad del vaso lo que produce la inhibición de grandes números de células tumorales (Folkman, J. (1995) *Nat. Med.* 1: 27-31). Por tanto, las células endoteliales son una buena diana para inmunoterapia contra el cáncer. Para prevenir específica y eficazmente la angiogénesis tumoral con respuesta de LTC, se necesita seleccionar la diana apropiada entre las moléculas relacionadas con la angiogénesis.

45 Los resultados presentados aquí, *in vitro* e *in vivo*, demuestran que se puede usar VEGFR1 como diana de terapia inmunológica usando inmunidad celular y apoya la razón fundamental definitiva del desarrollo clínico de esta estrategia contra una amplia gama de cánceres.

## Aplicabilidad industrial

50 La presente invención proporciona péptidos nuevos, que inducen células T citotóxicas dirigiéndose a células endoteliales en una amplia gama de tejidos tumorales, y son extremadamente eficaces como vacunas contra el cáncer. La presente invención también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden estos péptidos para el tratamiento y prevención de tumores.

55 Mientras que la invención se ha descrito en detalle y con referencia a formas de realización específicas de la misma, será aparente para el experto en la materia que se pueden hacer varios cambios y modificaciones en la misma sin separarse del espíritu y ámbito de la invención.

60 Además, la presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Un péptido aislado de menos de aproximadamente 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13.

2. Un péptido aislado que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13, en donde se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos.
- 5 3. El péptido del punto 2, en donde el segundo aminoácido a partir de extremo N es leucina o metionina.
4. El péptido del punto 2 o 3, en donde el aminoácido C-terminal es valina o leucina.
- 10 5. Un péptido aislado de menos de aproximadamente 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.
6. Un péptido aislado que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, en donde se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos.
- 15 7. El péptido del punto 6, en donde el segundo aminoácido a partir de extremo N es fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano.
8. El péptido del punto 6 o 7, en donde el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina.
- 20 9. Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de enfermedad mediada por angiogénesis o tumores, en donde la composición comprende 1 o más péptidos del punto 1, 2, 5 o 6.
- 25 10. Un exosoma que presenta en su superficie un complejo que comprende el péptido del punto 1, 2, 5 o 6 y un antígeno HLA.
11. El exosoma del punto 10, en donde el antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A02.
12. El exosoma del punto 11, en donde el antígeno HLA es HLA-A2402 o HLA-A0201.
- 30 13. Un método de inducir células presentadoras de antígeno que tienen alta inducibilidad de células T citotóxicas en un paciente, el método comprende administrar al paciente el péptido del punto 1, 2, 5 o 6.
- 35 14. Un método de inducir célula T citotóxicas en un paciente, el método comprende administrar al paciente el péptido del punto 1, 2, 5 o 6.
15. El método de inducir células presentadoras de antígeno que tienen alta inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el método comprende transferir un gen que comprende un polinucleótido que codifica el péptido del punto 1, 2, 5 o 6 a células presentadoras de antígeno.
- 40 16. Una célula T citotóxica aislada, que se induce administrando el péptido del punto 1, 2, 5 o 6.
17. Una célula presentadora de antígeno aislada, que comprende un complejo formado entre un antígeno HLA y el péptido del punto 1, 2, 5 o 6.
- 45 18. La célula presentadora de antígeno del punto 17, que se induce por el método del punto 13.
19. Una vacuna para inhibir la angiogénesis en un sitio de enfermedad, en donde la vacuna comprende el péptido del punto 1, 2, 5 o 6 como principio activo.
- 50 20. La vacuna del punto 19, que se pretende para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A02.
21. La vacuna del punto 19, que se usa para suprimir el crecimiento de y/o la metástasis de tumores malignos.
- 55 22. Un método de tratar o prevenir tumores en un sujeto que comprende administrar al sujeto una vacuna que comprende un péptido del punto 1, 2, 5 o 6, o un fragmento inmunológicamente activo del péptido, o un polinucleótido que codifica el polipéptido.
- 60 23. Un método de tratar o prevenir una enfermedad mediada por angiogénesis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una vacuna que comprende un péptido del punto 1, 2, 5 o 6, o un fragmento inmunológicamente activo del péptido, o un polinucleótido que codifica el polipéptido.
- 65 24. El método del punto 23, en donde la enfermedad mediada por angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis y ateroesclerosis.

**Lista de secuencias**

- 5 <110> ONCOTERAPHY SCIENCE, INC.
- <120> PÉPTIDOS EPÍTOPOS DERIVADOS DEL RECEPTOR 1 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y VACUNAS QUE CONTIENEN ESTOS PÉPTIDOS
- 10 <130> N2664 EP/2 S3
- <140> EP 06 71 4491.5  
<141> 17-02-2006
- 15 <150> US 60/657.527  
<151> 28-02-2005
- <160> 45
- 20 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"
- 30 <400> 1  
Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu  
1 5
- <210> 2  
35 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
40 <221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
<400> 2  
Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu  
1 5
- 45 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"
- 55 <400> 3  
Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val  
1 5
- <210> 4  
<211> 9  
60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 4

Cys Val Ala Ala Thr Leu Phe Trp Leu

1 5

10 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 5

Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu

20 1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

30 <400> 6

Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala

1 5

<210> 7

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 7

Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu Thr

45 1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

55 <400> 8

Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu

1 5

5        <210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 10      <400> 9  
 Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val  
 1                        5  
 15      <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 10  
 Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr  
 1                        5  
 25      <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 35      <400> 11  
 Lys Leu Gly Asp Leu Leu Gln Ala Asn Val  
 1                        5                        10  
 40      <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 12  
 Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile  
 1                        5                        10  
 50      <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 13  
Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val  
1 5 10

5 <210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

15 <400> 14  
Ser Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val  
1 5 10

20 <210> 15  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

30 <400> 15  
Gln Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu  
1 5 10

35 <210> 16  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

45 <400> 16  
Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu  
1 5 10

50 <210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

60 <400> 17  
Ile Ile Met Asp Pro Asp Glu Val Pro Leu  
1 5 10

65 <210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 5 <400> 18  
 Phe Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu  
 1 5 10  
  
 <210> 19  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
  
 <400> 19  
 Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile  
 1 5 10  
  
 20 <210> 20  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
  
 <400> 20  
 Ile Leu Leu Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr  
 30 1 5 10  
  
 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 40 <400> 21  
 Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu  
 1 5  
  
 <210> 22  
 45 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
  
 <400> 22  
 Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu  
 1 5  
 55 <210> 23  
 <211> 9

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 23  
Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu  
1 5

10 <210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

20 <400> 24  
Arg Tyr Val Asn Ala Phe Lys Phe Met  
1 5

<210> 25  
<211> 9

25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
30 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 25  
Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile  
1 5

35 <210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

<400> 26  
Arg Phe Ala Glu Leu Val Glu Lys Leu  
45 1 5

<210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

55 <400> 27  
Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu  
1 5

5        <210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 10      <400> 28  
 Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu  
 1                5  
 15      <210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 29  
 Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu  
 1                5  
 25      <210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 35      <400> 30  
 Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe  
 1                5  
 <210> 31  
 <211> 10  
 40      <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 45      <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 31  
 Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe  
 1                5                        10  
 50      <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55      <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 32

Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe  
 1 5 10

5 <210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 33

Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly Met  
 1 5 10

15 <210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 34

Lys Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu  
 25 1 5 10

25 <210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"

35 <400> 35

Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe  
 35 1 5 10

40 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 36

Arg Tyr Val Asn Ala Phe Lys Phe Met Ser  
 50 1 5 10

50 <210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 37  
 Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile Leu  
 1 5 10  
 5  
 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 15 <400> 38  
 Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu  
 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 25 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 39  
 Glu Leu Val Glu Lys Leu Gly Asp Leu Leu  
 1 5 10  
 30 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 <400> 40  
 Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Leu  
 40 1 5 10  
 <210> 41  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
 50 <400> 41  
 Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Ile  
 1 5 10  
 <210> 42  
 55 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5                   <220>  
                  <221> fuente  
                  <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
10                  <400> 42  
                  Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val  
                  1                   5  
  
10                  <210> 43  
                  <211> 9  
                  <212> PRT  
                  <213> Secuencia artificial  
  
15                  <220>  
                  <221> fuente  
                  <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente"  
20                  <400> 43  
                  Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe  
                  1                   5  
  
20                  <210> 44  
                  <211> 5777  
                  <212> ADN  
                  <213> Homo sapiens  
25                  <400> 44

gcggacactc	ctctcggtc	ctccccggca	gcggcggcgg	ctcgagcgg	gctccggggc	60
tcgggtgcag	cggccagcgg	gcctggcggc	gaggattacc	cggggaaagtg	gttgtctcct	120
ggctggagcc	gcgagacggg	cgctcagggc	gcggggccgg	cggcggcgaa	cgagaggacg	180
gactctggcg	gccgggtcgt	tggccggggg	agcgcggca	ccgggchgac	aggccgcgtc	240
gcgctcacca	tggtcagcta	ctgggacacc	ggggtcctgc	tgtgcgcgtc	gctcagctgt	300
ctgcttctca	caggatctag	ttcaggttca	aaattaaaaag	atccctgaact	gagtttaaaa	360
ggcacccagc	acatcatgca	agcaggccag	acactgcac	tccaatgcag	gggggaagca	420
gcccataaaat	ggtctttgcc	tgaaatggtg	agtaagggaaa	gcgaaaggct	gagcataact	480
aaatctgcct	gtggaagaaa	tggcaaacaa	ttctgcagta	ctttaacctt	gaacacagct	540
caagcaaacc	acactggctt	ctacagctgc	aaatatctag	ctgtacctac	ttcaaagaag	600
aaggaaacag	aatctgcaat	ctatataattt	attagtgata	caggttagacc	ttcgttagag	660
atgtacagtg	aaatccccga	aattatacac	atgactgaag	gaaggagct	cgtcattccc	720
tgccgggtta	cgtcacctaa	catcactgtt	actttaaaaa	agtttccact	tgacactttg	780
atccctgatg	gaaaacgcac	aatctggac	agtagaaagg	gcttcatcat	atcaaatgca	840
acgtacaaag	aaatagggct	tctgacctgt	gaagcaacag	tcaatggca	tttgtataag	900
acaaaactatc	tcacacatcg	acaaaccaat	acaatcatag	atgtccaaat	aagcacacca	960
cgtccagtc	aattacttag	aggccatact	cttgcctca	attgtactgc	taccactccc	1020
ttgaacacga	gagttcaaatt	gacctggagt	taccctgatg	aaaaaaataa	gagagcttcc	1080
gtaaaggcgac	gaattgacca	aagcaattcc	catgccaaca	tattctacag	ttttcttact	1140
attgacaaaaa	tgcagaacaa	agacaaagga	ctttatactt	gtcggttaag	gagtggacca	1200
tcattcaaatt	ctgttaacac	ctcagtgcat	atatatgata	aagcattcat	cactgtgaaa	1260
catcgaaaac	agcaggtgct	tgaaaccgta	gctggcaagc	ggtcttaccg	gctctctatg	1320
aaagtgaagg	catttcctc	gccggaagtt	gtatggtaa	aagatgggtt	acctgcgact	1380

gagaaatctg	ctcgctattt	gactcggtgc	tactcgtaa	ttatcaagga	cgtaactgaa	1440
gaggatgcag	ggaattatac	aatcttgcgt	agcataaaac	agtcaaatgt	gtttaaaaac	1500
ctcaactgcca	ctctaattgt	caatgtaaa	ccccagattt	acgaaaaggc	cgtgtcatcg	1560
tttccagacc	cggctctcta	cccactgggc	agcagacaaa	tcctgacttg	taccgcatat	1620
ggtatccctc	aacctacaat	caagtggttc	tggcacccct	gtaaccataa	tcattccgaa	1680
gcaagggtgt	actttgttc	caataatgaa	gagtcctta	tcctggatgc	tgacagcaac	1740
atggaaaca	gaattgagag	catcaactcg	cgcacggcaa	taatagaagg	aaagaataag	1800
atggctagca	ccttgggtgt	ggctgactct	agaatttctg	gaatctacat	ttgcatacg	1860
tccaataaaag	ttgggactgt	ggaagaaaac	ataagctttt	atatcacaga	tgtgccaat	1920
gggttcatg	ttaacttgg	aaaaatgccc	acggaaggag	aggacctgaa	actgtctgc	1980
acagtttaca	agttcttata	cagagacgtt	acttggattt	tactgcggac	agttaataac	2040
agaacaatgc	actacagtat	tagcaagcaa	aaaatggcca	tcactaagga	gcactccatc	2100
actcttaatc	ttaccatcat	gaatgtttcc	ctgcaagatt	caggcaccta	tgcctgcaga	2160
gccaggaatg	tatacacagg	ggaagaaaatc	ctccagaaga	aagaaattac	aatcagagat	2220
caggaagcac	cataccctc	gcgaaaccc	agtgatcaca	cagtggccat	cagcagttcc	2280
accactttag	actgtcatgc	taatgggtgc	cccgagcctc	agatcacttg	gtttaaaaac	2340
aaccacaaaa	tacaacaaga	gcctggattt	attttaggac	caggaaggcag	cacgctgttt	2400
attgaaagag	tcacagaaga	ggatgaaggt	gtctatcact	gcaaagccac	caaccagaag	2460
ggctctgtgg	aaagttcagc	atacctca	gttcaaggaa	cctcggacaa	gtctaattctg	2520
gagctgatca	ctctaacatg	cacctgtgt	gctgcgactc	tcttctggct	cctattaacc	2580
ctccttatcc	aaaaatgaa	aagggtttct	tctgaaataa	agactgacta	cctatcaatt	2640
ataatggacc	cagatgaagt	tcctttggat	gagcagtgt	agcggctccc	ttatgatgcc	2700
agcaagtgg	agtttgcgg	ggagagactt	aaactggca	aatcacttg	aagaggggct	2760
tttggaaaag	tggttcaagc	atcagcattt	ggcattaaga	aatcacctac	gtgccggact	2820
gtggctgtga	aaatgctgaa	agagggggcc	acggccagcg	agtacaaagc	tctgatgact	2880
gagctaaaaaa	tcttgacc	cattggccac	catctgaacg	tggtaacct	gctgggagcc	2940
tgcaccaagc	aaggagggcc	tctgatgg	attgttgaat	actgcaaata	tggaaatctc	3000
tccaactacc	tcaagagcaa	acgtgactta	tttttctca	acaaggatgc	agcactacac	3060
atggagccta	agaaagaaaa	aatggagcca	ggcctggaa	aaggcaagaa	accaagacta	3120
gatagcgtca	ccagcagcga	aagctttgcg	agctccggct	ttcaggaaga	taaaagtctg	3180
agtgatgtt	aggaagagga	ggattctgac	ggtttctaca	aggagccat	cactatggaa	3240
gatctgattt	cttacagttt	tcaagtggcc	agaggcatgg	agttcctgtc	ttccagaaag	3300
tgcattcatc	gggacctggc	agcgagaaac	attctttat	ctgagaacaa	cgtggtaag	3360
atttgtgattt	ttggccttgc	ccggatattt	tataagaacc	ccgattatgt	gagaaaagga	3420

gatactcgac	ttcctctgaa	atggatggct	cccgaaatcta	tcttgacaa	aatctacagc	3480
accaagagcg	acgtgtggtc	ttacggagta	ttgctgtggg	aaatcttctc	cttaggtggg	3540
tctccatacc	caggagtaca	aatggatgag	gactttgca	gtcgctgag	ggaaggcatg	3600
aggatgagag	ctcctgagta	ctctactcct	gaaatctatc	agatcatgct	ggactgctgg	3660
cacagagacc	caaaagaaag	gccaagattt	gcagaacttg	tggaaaaact	aggtgatttg	3720
cttcaagcaa	atgtacaaca	ggatggtaaa	gactacatcc	caatcaatgc	catactgaca	3780
gaaaatagt	ggtttacata	ctcaactcct	gccttctctg	aggacttctt	caaggaaagt	3840
atttcagctc	cgaagttaa	ttcaggaagc	tctgatgatg	tcagatatgt	aaatgcttc	3900
aagttcatga	gcctgaaaag	aatcaaaacc	tttgaagaac	ttttaccgaa	tgccaccc	3960
atgtttgatg	actaccaggg	cgacagcagc	actctgttgg	cctctccat	gctgaagcgc	4020
ttcacctgga	ctgacagcaa	acccaaggcc	tcgctcaaga	ttgacttgag	agtaaccagt	4080
aaaagtaagg	agtcggggct	gtctgatgtc	agcaggccca	gtttctgcca	ttccagctgt	4140
gggcacgtca	gcgaaggcaa	gcmcaggttc	acctacgacc	acgctgagct	ggaaaggaaa	4200
atcgctgtct	gctccccgcc	cccagactac	aactcggtgg	tcctgtactc	cacccacccc	4260
atctagagtt	tgacacgaag	ccttatttct	agaagcacat	gtgtattttat	accccccagga	4320
aactagctt	tgccagtttatt	atgcatatat	aagtttacac	ctttatcttt	ccatgggagc	4380
cagctgctt	ttgtgatttt	tttaatagtg	cttttttttt	ttgactaaca	agaatgtAAC	4440
tccagataga	gaaatagtga	caagtgaaga	acactactgc	taaatcctca	tgttactcag	4500
tgtagagaa	atccttccta	aacccaatga	cttccctgtct	ccaaacccccc	ccacccctagg	4560
gcacgcagga	ccagtttgat	tgaggagctg	cactgatcac	ccaatgcac	acgtacccca	4620
ctggccagc	cctgcagccc	aaaacccagg	gcaacaagcc	cgttagcccc	aggggatcac	4680
tggctggcct	gagcaacatc	tcgggagtcc	tctagcaggc	ctaaagacatg	tgaggaggaa	4740
aaggaaaaaaa	agcaaaaagc	aagggagaaa	agagaaaccg	ggagaaggca	tgagaaagaa	4800
tttgagacgc	accatgtggg	cacggaggggg	gacggggctc	agcaatgcca	tttcagtggc	4860
ttcccagctc	tgacccttct	acatttgagg	gcccagccag	gagcagatgg	acagcgatga	4920
ggggacattt	tctggattct	gggaggcaag	aaaaggacaa	atatttttt	tggaactaaa	4980
gcaaattttt	gaccttacc	tatggaagtg	gttctatgtc	cattctcatt	cgtggcatgt	5040
tttgatttgt	agcaactgagg	gtggcactca	actctgagcc	catactttt	gctcctctag	5100
taagatgcac	tgaaaactta	gccagagtta	ggttgtctcc	aggccatgtat	ggccttacac	5160
tgaaaatgtc	acattctatt	ttgggtattta	atatatagtc	cagacactta	actcaatttc	5220
tttgttattat	tctgtttgc	acagtttagtt	gtgaaagaaa	gctgagaaga	atgaaaatgc	5280
agtccctgagg	agagttttct	ccatatcaaa	acgagggctg	atggaggaaa	aaggtcaata	5340
aggtcaaggg	aagaccccg	ctctataccca	accaaaccaa	ttcaccaca	cagttgggac	5400
ccaaaacaca	ggaagtca	cacgtttcct	tttcatttaa	tggggattcc	actatctcac	5460
actaatctga	aaggatgtgg	aagagcatta	gctggcgcac	attaagcact	ttaagctcct	5520

ttagtaaaaa ggtggtatgt aatttatgca aggtatttct ccagttggga ctcaggatat	5580
tagttaatga gccatcacta gaagaaaaagc ccattttcaa ctgcttgaa acttgcctgg	5640
ggtctgagca ttagtggaaat agggagacag ggttaggaaag ggcgcctact cttcagggtc	5700
taaagatcaa gtgggccttg gatcgctaag ctggctctgt ttgatgctat ttatgcaagt	5760
tagggtctat gtattta	5777

<210> 45

<211> 1338

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser			
1	5	10	15
10	15		

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro			
20	25	30	
30			

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr			
35	40	45	
45			

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro			
50	55	60	
60			

Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala			
65	70	75	80
75	80		

Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr			
85	90	95	
95			

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val			
100	105	110	
110			

Pro Thr Ser Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile			
115	120	125	
125			

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu			
130	135	140	
140			

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val			
145	150	155	160
155	160		

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr			
165	170	175	
175			

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe			
180	185	190	
190			

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu			
195	200	205	
205			

ES 2 435 650 T3

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg  
210 215 220

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val  
225 230 235 240

Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr  
245 250 255

Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys  
260 265 270

Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His  
275 280 285

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys  
290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys  
305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val  
325 330 335

Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser  
340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val  
355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu  
370 375 380

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala  
385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys  
405 410 415

Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu  
420 425 430

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser  
435 440 445

Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile  
450 455 460

Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys  
465 470 475 480

ES 2 435 650 T3

Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser  
485 490 495

Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile  
500 505 510

Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu val val Ala Asp Ser Arg  
515 520 525

Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys val Gly Thr Val  
530 535 540

Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His  
545 550 555 560

val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser  
565 570 575

cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu  
580 585 590

Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys  
595 600 605

Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met  
610 615 620

Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn  
625 630 635 640

val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg  
645 650 655

Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val  
660 665 670

Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro  
675 680 685

Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu  
690 695 700

Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg  
705 710 715 720

Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln  
725 730 735

Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Gly Thr Ser  
740 745 750

## ES 2 435 650 T3

Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr Cys Thr Cys Val Ala  
 755 760 765

Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile Arg Lys Met Lys  
 770 775 780

Arg Ser Ser Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp  
 785 790 795 800

Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp  
 805 810 815

Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu Gly Lys Ser  
 820 825 830

Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Gln Ala Ser Ala Phe Gly  
 835 840 845

Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys  
 850 855 860

Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys  
 865 870 875 880

Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly  
 885 890 895

Ala Cys Thr Lys Gln Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys  
 900 905 910

Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe  
 915 920 925

Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys  
 930 935 940

Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val  
 945 950 955 960

Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser  
 965 970 975

Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu  
 980 985 990

Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg  
 995 1000 1005

Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu  
 1010 1015 1020

Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile

## ES 2 435 650 T3

1025	1030	1035
Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr		
1040	1045	1050
Val Arg Lys Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro		
1055	1060	1065
Glu Ser Ile Phe Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp		
1070	1075	1080
Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser		
1085	1090	1095
Pro Tyr Pro Gly Val Gln Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu		
1100	1105	1110
Arg Glu Gly Met Arg Met Arg Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu		
1115	1120	1125
Ile Tyr Gln Ile Met Leu Asp Cys Trp His Arg Asp Pro Lys Glu		
1130	1135	1140
Arg Pro Arg Phe Ala Glu Leu Val Glu Lys Leu Gly Asp Leu Leu		
1145	1150	1155
Gln Ala Asn Val Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Pro Ile Asn		
1160	1165	1170
Ala Ile Leu Thr Gly Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Ser Thr Pro Ala		
1175	1180	1185
Phe Ser Glu Asp Phe Phe Lys Glu Ser Ile Ser Ala Pro Lys Phe		
1190	1195	1200
Asn Ser Gly Ser Ser Asp Asp Val Arg Tyr Val Asn Ala Phe Lys		
1205	1210	1215
Phe Met Ser Leu Glu Arg Ile Lys Thr Phe Glu Glu Leu Leu Pro		
1220	1225	1230
Asn Ala Thr Ser Met Phe Asp Asp Tyr Gln Gly Asp Ser Ser Thr		
1235	1240	1245
Leu Leu Ala Ser Pro Met Leu Lys Arg Phe Thr Trp Thr Asp Ser		
1250	1255	1260
Lys Pro Lys Ala Ser Leu Lys Ile Asp Leu Arg Val Thr Ser Lys		
1265	1270	1275
Ser Lys Glu Ser Gly Leu Ser Asp Val Ser Arg Pro Ser Phe Cys		
1280	1285	1290

ES 2 435 650 T3

His Ser Ser Cys Gly His Val Ser Glu Gly Lys Arg Arg Phe Thr  
1295 1300 1305

Tyr Asp His Ala Glu Leu Glu Arg Lys Ile Ala Cys Cys Ser Pro  
1310 1315 1320

Pro Pro Asp Tyr Asn Ser Val Val Leu Tyr Ser Thr Pro Pro Ile  
1325 1330 1335

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

5

Fig.1

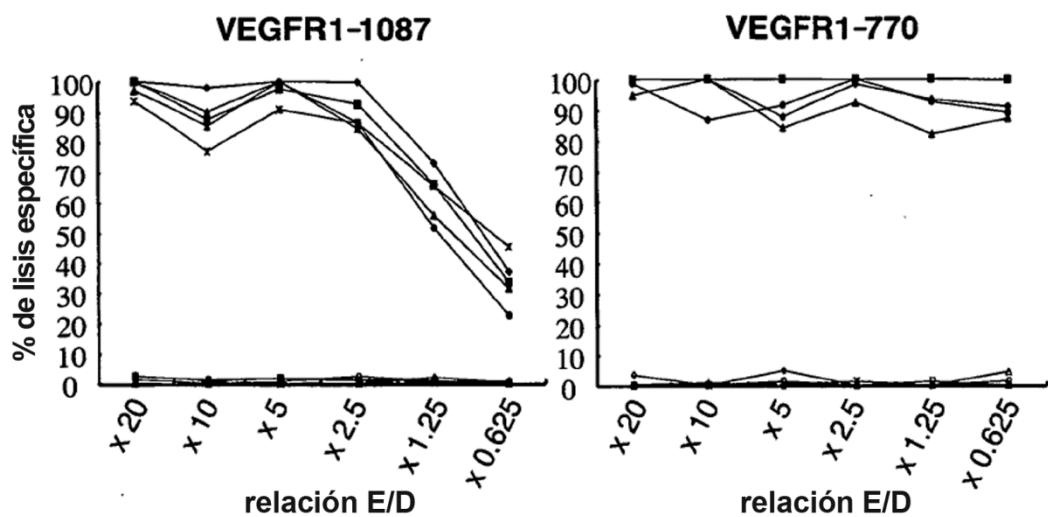


Fig. 2

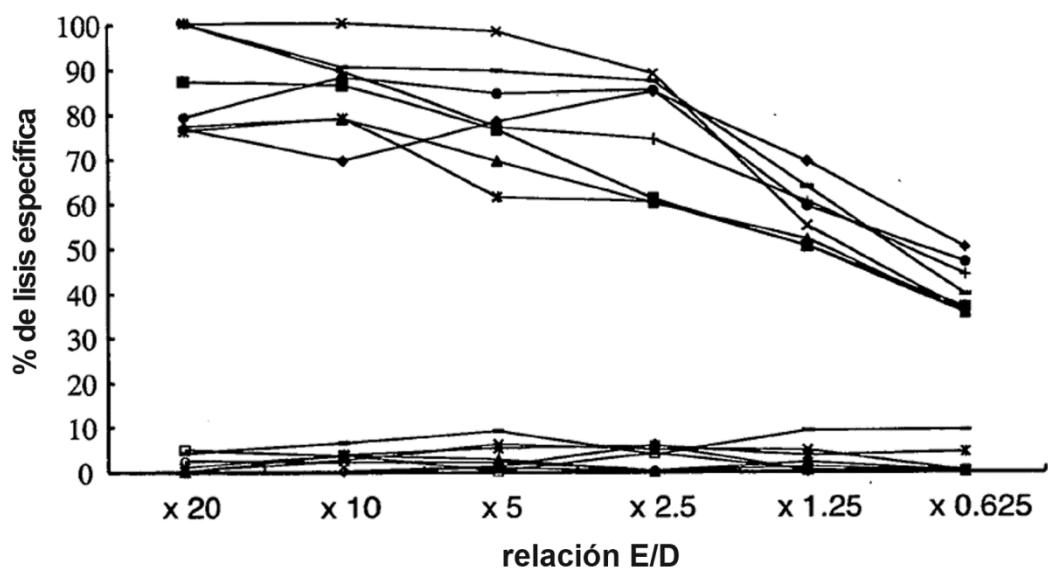


Fig. 3

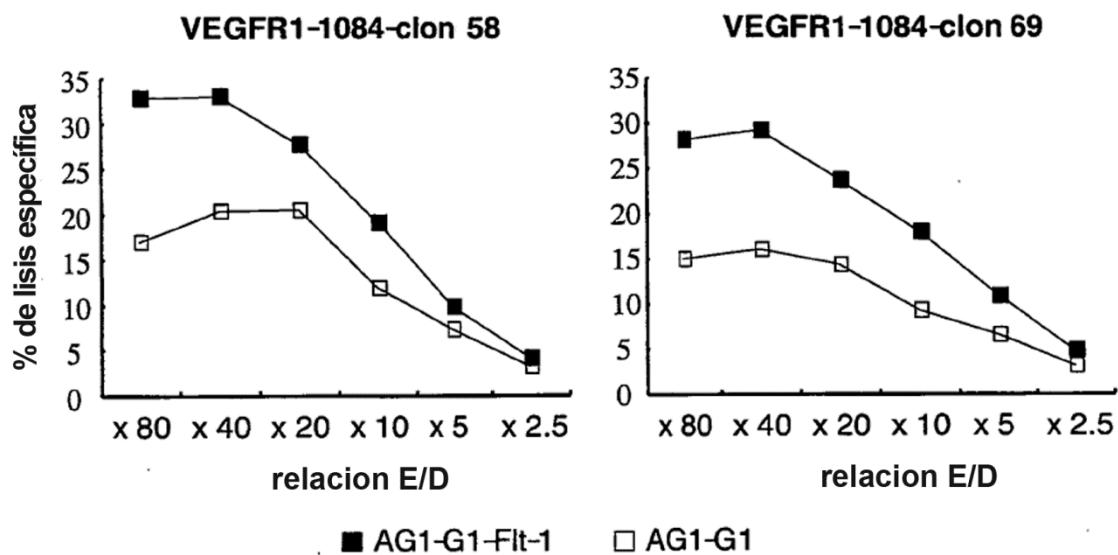


Fig. 4

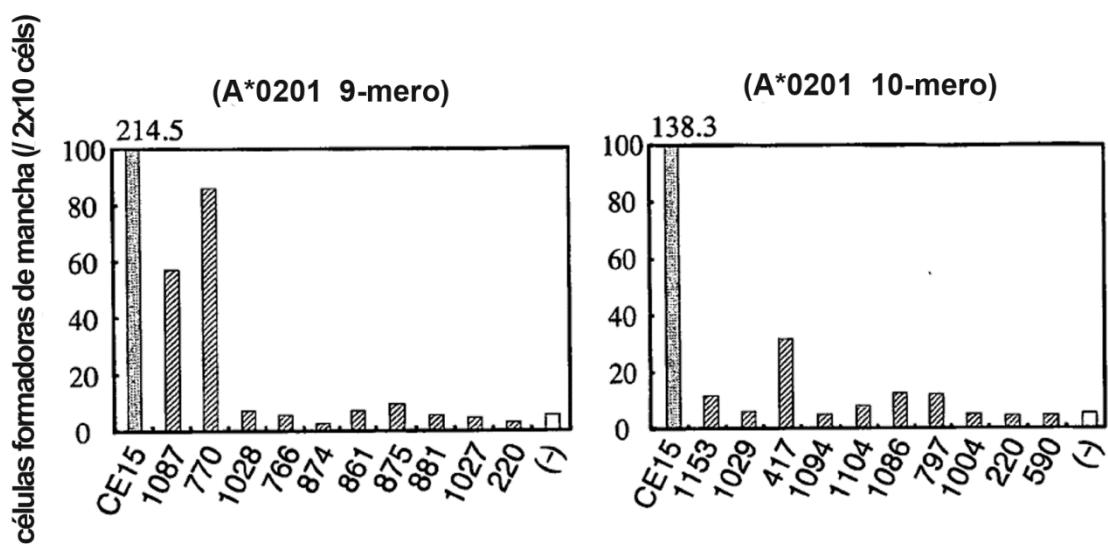


Fig. 5

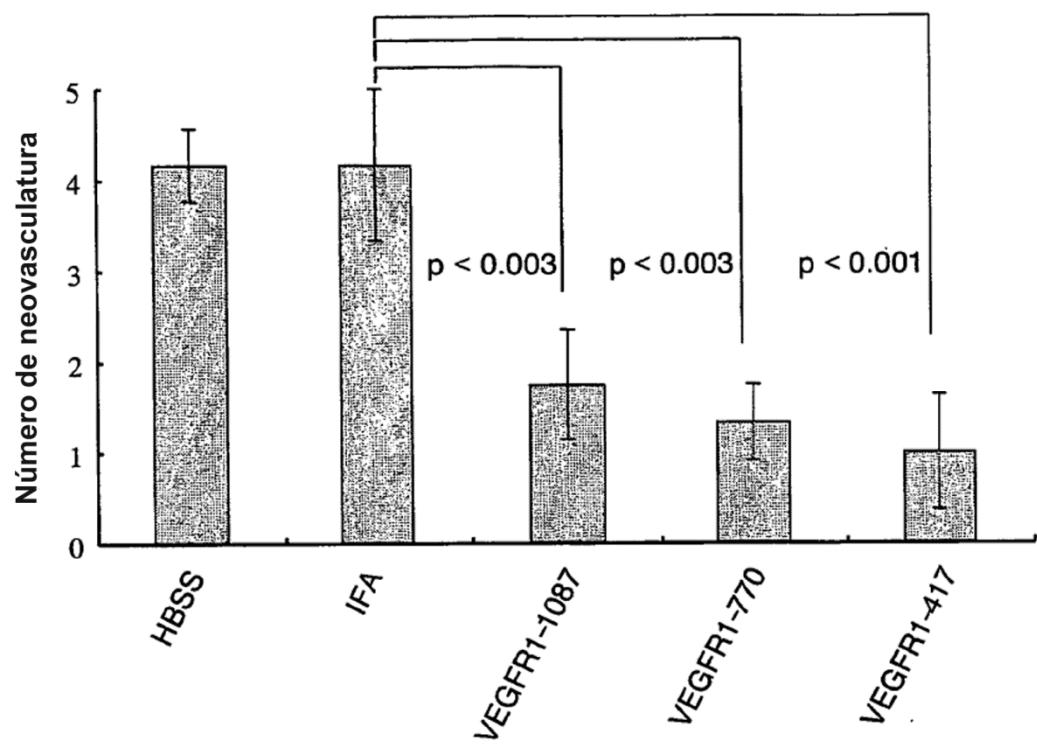


Fig. 6

