



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 329**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03711811 .4**
96 Fecha de presentación : **11.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1502599**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2005**

54 Título: **Uso de VEGF mutado para la terapia antiangiogénica.**

30 Prioridad: **15.04.2002 CU 2007602**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.09.2011

73 Titular/es: **Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)**
Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacan Playa
Ciudad de La Habana 10600, CU

72 Inventor/es: **Bequet Romero, Monica;**
Acevedo Castro, Boris, Ernesto;
Gavilondo Cowley, Jorge, Victor;
Fernández Molina, Luis, Enrique;
López Ocejo, Omar;
Silva Rodríguez, Ricardo, de la Caridad;
Musachio Lasa, Alexis;
Galban Rodríguez, Ernesto y
Vázquez Blomquist, Dania, Marcia

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 329 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

Uso de VEGF mutado para la terapia antiangiogénica

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y de la industria farmacéutica, en particular a una inmunización activa que emplea como diana moléculas relacionadas con la angiogénesis.

5 El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes se denomina angiogénesis. Este acontecimiento está extensamente regulado mediante el equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Entre las enfermedades cuyo desarrollo se ha relacionado con la inducción de factores proangiogénicos y la formación de nuevos vasos sanguíneos de forma anómala están: (a) el cáncer (tumores primarios y sus metástasis); (b) procesos inflamatorios agudos y crónicos, tales como asma, insuficiencia respiratoria, endometriosis, aterosclerosis, y edema tisular; (c) enfermedades de origen infeccioso, tales como hepatitis y sarcoma de Kaposi; (d) enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, tiroiditis; y (e) otras enfermedades y estados, tales como retinopatías diabéticas y del recién nacido, rechazo al trasplante de órganos, degeneración macular, glaucoma neovascular, hemangioma, y angiofibroma (Carmeliet P. y Jain R.K., *Nature*, 407:249, 2000; Kuwano M. et al., *Intern. Med.*, 40:565, 2001). Un procedimiento terapéutico potencialmente atractivo para muchos de estos casos podría basarse en la inhibición de la actividad de los factores proangiogénicos, que estimulan la formación anómala de vasos sanguíneos, a través de su neutralización o de la neutralización de sus receptores, o eliminando las fuentes que los producen.

Los factores del crecimiento del endotelio vascular son una familia de moléculas que inducen la formación de nuevos vasos de manera específica y directa (Leung, *Science*, 246:1306, 1989; Kiagsbum M., *Annual Rev. Physiol.*, 33:217, 1991). Esta familia incluye el factor de permeabilidad vascular, también conocido como factor del crecimiento del endotelio vascular VPF/VEGF (ahora denominado VEGF-A), el factor del crecimiento de la placenta PIGF, los factores del crecimiento derivados de plaquetas PDGF-A y PDGF-B, y otras cuatro moléculas nuevas relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional con el VEGF-A, denominadas VEGF-BNRF, VEGF-C/VRP, VEGD-D/FIGF y VEGF-E (Olofsson B. et al., *PNAS USA*, 13:2576, 1996; Joukov V. et al., *EMBO J.*, 15:290, 1996; Yamada Y. et al., *Genomics*, 42:483, 1997; Ogawa S. et al., *J. Biol. Chem.*, 273:31273, 1998).

El VEGF-A es una glicoproteína homodimérica formada por dos subunidades de 23 kDa (Ferrara N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:198, 1989), de las cuales existen cinco isoformas monoméricas, derivadas del corte y empalme diferencial del mismo ARN. Estas incluyen dos isoformas que permanecen unidas a la membrana celular (VEGF 189 y VEGF 206), y tres de naturaleza soluble (VEGF 121, VEGF 145 y VEGF 165). La VEGF 165 es la isoforma más abundante en tejidos de mamífero, excepto el pulmón y el corazón en que predomina la VEGF 189 (Neufeld G. et al., *Canc. Met. Rev.*, 15:153, 1995), y en la placenta, en la que predomina la expresión de VEGF 121 (Shibuya M.A. et al., *Adv. Canc. Res.*, 67:281, 1995).

El VEGF-A es la proteína mejor estudiada y caracterizada de esta familia, y su alteración se ha descrito en un gran número de enfermedades. Su sobreexpresión está asociada a tumores de diferente origen y localización y sus metástasis (Grunstein J. et al., *Cancer Res.*, 59:1592, 1999), a procesos inflamatorios crónicos, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Kanazawa S. et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 96:822, 2001), a la psoriasis (Detmar M., et al., *J. Exp. Med.*, 180:1141, 1994), a la insuficiencia respiratoria (Thickett D.R. et al., *Am. Respir. Crit. Care Med.*, 164:1601, 2001), a la aterosclerosis (Celletti F.L. et al., *Nat. Med.*, 7:425, 2001; Couffignal T. et al., *Am. J. Pathol.*, 150:1653, 1997), a la endometriosis (McLaren J., *Hum. Reprod. Update*, 6:45, 2000), al asma (Hoshino M. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107:295, 2001), a la artritis reumatoide y a la osteoartritis (Pufe T. et al., *J. Rheumatol.*, 28:1482, 2001), a la tiroiditis (Nagura S. et al., *Hum. Pathol.* 32:10, 2001), a las retinopatías diabéticas y del recién nacido (Murata T. et al., *Lab. Invest.*, 74:819, 1996; Reynolds J.D., *Paediatr. Drugs*, 3:263, 2001), a la degeneración macular y al glaucoma (Wells J.A. et al., *Br. J. Ophthalmol.*, 80:363, 1996; Tripathi R.C. et al., *Ophthalmology*, 105:232, 1998), al edema tisular (Kaner R.J. et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 22:640, 2000; Ferrara N., *Endocrinol Rev.*, 13:18, 1992), a la obesidad (Tonallo C. et al., *FEBS Lett.*, 442:167, 1999), a los hemangiomas (Wizigmann S. y Plate K.H., *Histol. Histopathol.*, 11:1049, 1996), en el fluido sinovial de pacientes con artropatías inflamatorias (Bottomley M.J. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 119:182, 2000), y asociada al rechazo de trasplantes (Vasir B. et al., *Transplantation*, 71:924, 2001). En el caso concreto de los tumores, las células que expresan las tres isoformas básicas de VEGF-A: 121, 165, y 189, son las que crecen con mayor rapidez *in vivo*; mientras que en las etapas finales, la mayoría de los tumores limitan la expresión a la isoforma VEGF 165 o, en su ausencia, a una combinación de 121 y 189 que, lejos de ser aditiva, evidencia una cooperación que refuerza la red vascular tumoral (Grunstein J., *Mol. Cell. Biol.*, 20:7282, 2000).

El PIGF, descrito en 1991, no es capaz de inducir la proliferación endotelial en su forma homodimérica (Maglione D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9267, 1991; DiSalvo J. et al., *J. Biol. Chem.*, 270:7717, 1995). Con la sobreexpresión de PIGF, y con ella, de la señal transducida a través de VEGFR-1, las células endoteliales amplifican sus respuestas al VEGF durante el cambio al fenotipo angiogénico asociado a ciertas patologías (Carmeliet P. et al., *Nat. Med.*, 7:575, 2001). La expresión de PIGF se ha relacionado con la vascularización del

- meningioma y glioma humanos (Nomura M. et al., J. Neurooncol., 40:123, 1998). Esta molécula forma heterodímeros con VEGF 165, con actividad proangiogénica, y se ha descrito su sobreexpresión en el medio acondicionado de algunas líneas de células tumorales (Cao Y. et al., J. Biol. Chem., 271:3154,1996), y está asociada a la evolución de la artritis reumatoide y a artropatías inflamatorias primarias, en general (Bottomley M.J. et al., Clin. Exp. Immunol., 119:182, 2000).
- La sobreexpresión del resto de los miembros de la familia VEGF, menos estudiados, también está asociada con una serie de patologías. El VEGF-B se ha relacionado con tumores de mama, de ovario y de riñón, y a melanomas y fibrosarcomas (Sowter H.M. et al., Lab. Invest., 77:607, 1997; Salven P., Am. J. Pathol., 153:103, 1998; Gunningham S.P. et al., Cancer Res., 61:3206, 2001). Se ha divulgado la expresión diferencial de la isoforma VEGF-B 167 *in vitro* en células tumorales de diverso origen (Li X. et al., Growth Factors. 19:49, 2001). El VEGF-C y el VEGF-D están implicados en la regulación de la formación de vasos linfáticos (Joukov V. et al., EMBO J., 15: 290, 1996), y la sobreexpresión de VEGF-C está asociada con edemas tisulares, con tumores de mama, de pulmón, de cabeza y cuello, de esófago y de estómago, linfomas, cáncer de próstata, y nódulos metastásicos (Kajita T. et al., Br. J. Cancer., 85:255, 2001; Kitadī Y. et al., Int. J. Cancer, 93:662, 2001; Hashimoto I. et al., Br. J. Cancer, 85:93, 2001; Kinoshita J. et al., Breast Cancer Res. Treat., 66:159, 2001; Ueda M. et al., Gynecol. Oncol., 82:162, 2001; Salven P., Am. J. Pathol., 153:103, 1998; O-Charoenrat P. et al., Cancer, 92:556, 2001). En el caso del VEGF-D, su sobreexpresión por células tumorales está relacionada con un aumento *in vivo* de vasculatura linfática en los tumores y el aumento de metástasis en nódulos linfáticos (Stacker S.A. et al., Nat. Med., 7:186, 2001; Marconcini L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9671, 1999).
- Las alteraciones de la función de las células endoteliales inducidas por las moléculas de la familia de VEGF están mediadas por su unión a receptores celulares del tipo de tirosina quinasa de clase 3, que hasta la fecha incluyen: VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1), y VEGFR3 (Flt4) (Kalpainen A., J. Exp. Med., 178:2077, 1993). El dominio 2 N-terminal se ha identificado como el responsable de la unión a los ligandos, favoreciendo la fosforilación del dominio citoplásmico, y la transducción de la señal (Davis-Smyth T. et al., EMBO, 15:4919, 1996).
- Los ligandos identificados para VEGFR1 incluyen VEGF-A, PlGF, y VEGF-B, en orden decreciente de afinidad (Shibuya M., Int. J. Biochem. Cell Biol., 33: 409, 2001). En células endoteliales, este receptor captura el VEGF circulante (Gille H. et al., EMBO J., 19:4064, 2000). La unión de VEGF-A al VEGFR1 expresado sobre las células del linaje hematopoyético afecta significativamente a la activación del factor transcripcional NFκB en los precursores de células dendríticas, y en linfocitos B y T. Esta última interacción es importante para el establecimiento *in vivo* de un equilibrio inmunológico desfavorable, en el que se reduce la maduración de las células dendríticas y la fracción de linfocitos T, un fenómeno observado en pacientes inmunodeprimidos y, en particular, en el cáncer (Dikov M.M. et al., Canc. Res., 61:2015, 2001; Gabilovich D. et al., Blood, 92:4150, 1998). La sobreexpresión de VEGFR1 se ha relacionado con la psoriasis, el cáncer endometrial y el carcinoma hepatocelular (Detmar M. et al., J. Exp. Med., 180:1141, 1994; Ng I.O., Am. J. Clin. Patol., 116:838, 2001; Yokoyama Y. et al., Gynecol. Oncol., 77:413, 2000).
- El receptor VEGFR2 (KDR/Flk1) media en los efectos biológicos del VEGF-A, y también se une a VEGF-C y VEGF-D. Este receptor se expresa de modo diferencial sobre el endotelio activado y en algunas líneas celulares de origen tumoral en las que establece vías endocrinas con el VEGF segregado. Además de estar implicado en las patologías ya mencionadas que están relacionadas con la sobreexpresión de sus ligandos, la sobreexpresión de VEGFR2 se ha relacionado con el avance del cáncer endometrial (Giatromanolaki A. et al., Cancer, 92:2569, 2001), del mesotelioma maligno (Strizzi L. et al., J. Pathol., 193:468, 2001), de neoplasmas astrocíticos (Carroll R.S. et al., Cancer, 86:1335, 1999), del cáncer de mama primario (Kranz A. et al., Int. J. Cancer, 84:293, 1999), del cáncer gástrico de tipo intestinal (Takahashi Y. et al., Clin. Cancer Res., 2:1679, 1996), del glioblastoma multiforme, del oligodendroglioma anaplásico y del ependimoma necrótico (Chan A.S. et al., Am. J. Surg. Pathol., 22:816, 1998). La sobreexpresión de KDR también se ha asociado con la enfermedad autosómica VHL y con el hemangioblastoma (Wizigmann-Voos S. et al., Cancer Res., 55:1358, 1995), con el avance de la retinopatía diabética (Ishi-bashi T., Jpn. J. Ophthalmol., 44:323, 2000) y, en combinación con la sobreexpresión de Flt-1, con reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado (Brown L.F. et al., J. Immunol., 154:2801, 1995).
- La linfangiogénesis mediada por VEGF-C y VEGF-D resulta de su unión al receptor FLT4 o VEGFR3, expresados sobre el endotelio linfático. En algunos casos, incluso cuando la sobreexpresión de los ligandos no está presente, la sobreexpresión del receptor se ha relacionado con una prognosis adversa en el desarrollo de un grupo de entidades patológicas, incluyendo retinopatía diabética (Smith G., Br. J. Ophthalmol., abril de 1999, 83(4):486-494), inflamación crónica y úlceras (Paavonen K. et al., Am. J. Pathol., 156:1499, 2000), el establecimiento de metástasis en nódulos linfáticos y el avance del cáncer de mama (Gunningham S.P., Clin. Cancer Res., 6:4278, 2000; Valtola R. et al., Am. J. Pathol., 154:1381, 1999), asociada a tumores nasofaríngeos y a carcinomas orales escamosos (Saaristo A. et al., Am. J. Pathol., 157:7, 2000; Moriyama M. et al., Oral Oncol., 33:369, 1997). Además, la sobreexpresión de VEGFR3 es un marcador sensible del sarcoma de Kaposi, el hemangioendotelioma de tipo Dabska y de la linfangiomatosis cutánea (Folpe A.L. et al., Mod. Pathol., 13:180, 2000; Lymboussaki A. et al., Am. J. Pathol., 153:395, 1998).

En fechas recientes, se han identificado dos receptores para VEGF, denominados NRP1 y NRP2. Pertenecen a la familia de las neurofilinas (NRP), y actúan como correceptores para algunas isoformas específicas de proteínas de la familia de VEGF: VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-B₁₆₇ y PIGF1, aumentando su capacidad mitogénica. La expresión de NRP1 se ha convertido en un marcador de la agresividad del cáncer de próstata, se ha relacionado con el aumento de la angiogénesis en melanomas, y con acontecimientos de escape de apoptosis en el cáncer de mama (Latil A. et al., *Int. J. Cancer*, 89:167, 2000; Lacal P.M., *J. Invest. Dermatol.*, 115:1000, 2000; Bachelder R.E., *Cancer Res.*, 61:5736, 2001). La sobreexpresión coordinada de NRP1, KDR, y VEGF-A₁₆₅ se ha relacionado con la proliferación fibrovascular en casos de retinopatía diabética y en la artritis reumatoide (Ishida S. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 1649, 2000; Ikeda M. et al., *J. Pathol.*, 191:426, 2000). El NRP2 se sobreexpresa en osteosarcomas, en donde estimula la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Handa A. et al., *Int. J. Oncol.*, 17:291, 2000).

La mayoría de las estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la angiogénesis, en especial en el tratamiento del cáncer, se basan en el bloqueo de moléculas de la familia de VEGF y sus receptores, habiendo ensayos clínicos en desarrollo que emplean: (1) anticuerpos monoclonales que bloquean el VEGF o el receptor KDR; (2) inhibidores de metaloproteínasa, tales como neovastato y prinomastato; (3) inhibidores de VEGF, tales como talidomida, suramina, troponina I, e IFN- α y neovastato; (4) bloqueantes de receptores de VEGF, tales como SU5416, FTK787 y SU6668; (5) inductores de la apoptosis del endotelio tumoral, tales como endostatina y CA4-P y (6) ribozimas que disminuyen la expresión de VEGF o de receptores de VEGF (angiozima). Debido a la alta homología entre la VEGF humana y sus receptores KDR y Flt-1 con sus homólogos murinos (aproximadamente 90%, 81% y 89%, respectivamente), muchos modelos animales se emplean de modo habitual para evaluar la eficacia preclínica de los compuestos antiangiogénicos dirigidos a este sistema (Hicklin D.J. et al., *DDT*, 6:517, 2001).

La administración pasiva de anticuerpos contra VEGF o VEGFR se ha ensayado con éxito en diferentes fases clínicas en seres humanos (Hicklin D.J. et al., *DDT*, 6:517, 2001). El anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF A.4.6.1 (Genentech, San Francisco, EEUU) está en un ensayo clínico de fase III para el tratamiento de tumores de colon, mama, riñón y pulmón (Kim K.J. et al., *Nature*, 362:841, 1993; Boersig C., *R&D Directions*, octubre, 7:44, 2001). En particular, para el caso del receptor KDR, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal (IMC-1C11, ImClone) que reconoce el dominio extracelular N-terminal de este receptor, e inhibe la proliferación y la migración de células humanas leucémicas, aumentando la supervivencia de ratones xenotransplantados. En la actualidad, su efecto está siendo estudiado en pacientes con metástasis de cáncer de colon (Dias S. et al., *J. Clin. Invest.*, 106:511, 2000). En los ensayos mencionados, se ha demostrado la ausencia de efectos adversos concomitantes con la aplicación de estos anticuerpos monoclonales.

A pesar de lo indicado, una modalidad terapéutica que aún no se ha empleado para el bloqueo de la neoangiogénesis es la inmunoterapia activa específica (SAI). En la SAI del cáncer se emplean antígenos, tales como péptidos, proteínas o ADN, mezclados con los adyuvantes apropiados. Los procedimientos de SAI buscan la estimulación de una respuesta inmunológica, tanto de tipo humoral (activación de linfocitos B) como de tipo celular (activación de células T auxiliares, de linfocitos citotóxicos y de células asesinas naturales), asociada a la función de las células dendríticas como células presentadoras profesionales en los contextos de MCHI y MHC II (Bystryn J.C., *Medscape Hematology-Oncology*, 4:1, 2001; Parker K.C. et al., *J. Immunol.*, 152:163, 1994; Nestle F.O. et al., *Nature Medicine*, 7:761, 2001; Timmerman J.M., *Annual Review Medicine*, 50:507, 1999).

La SAI es un campo de investigación experimental y clínico que se está creciendo con rapidez, con aplicaciones atractivas, en especial en oncología, en donde se informa de la realización más de 60 ensayos clínicos en marcha basados en procedimientos de SAI, que superan en la actualidad a los ensayos clínicos basados en el uso de anticuerpos monoclonales. En el caso concreto del cáncer, los antígenos utilizados como inmunógenos para SAI se seleccionan debido a su importancia fisiológica y dificultad de ser sustituidos en los procesos de deriva fenotípica tumoral (Bodey B. et al., *Anticancer Research*, 20: 2665, 2000), y debido a su alta asociación específica con el crecimiento y la evolución de tejidos tumorales.

La estrategia para tratar el cáncer utilizando SAI también considera preferiblemente la identificación de antígenos expresados en diferentes tipos de tumores, que podría aumentar el número de indicaciones para la misma preparación de vacuna.

Los ejemplos de éstos son el antígeno carcinoembrionario (CEA), HER2-neu, telomerasa humana, y gangliósidos (Greener M., *Mol. Med. Today*, 6:257 2000; Rice J. et al., *J. Immunol.*, 167:1558, 2001; Carr A. et al., *Melanoma Res.*, 11: 219, 2001; Murray J.L. et al., *Semin. Oncol.*, 27:71, 2000).

En tumores humanos, el VEGF se sobreexpresa en el compartimento tumoral (Ferrara N., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:1, 1999), y se han demostrado unos altos niveles de VEGF y de sus receptores en la vasculatura asociada a tumores (Brekken R.A., *J. Control Release*, 74:173, 2001). Las células estromáticas también producen VEGF en respuesta a estímulos de células transformadas, con el resultado de que cuando se retiran las células tumorales, los niveles de VEGF persisten en los pacientes. La presencia de VEGF y sus receptores tiene un

valor práctico para el establecimiento de la prognosis y la estadificación clínica en casos de tumores de próstata, cérvix y mama (George D.J. et al., Clin. Cancer Res., 7:1932, 2001; Dobbs S.P. et al., Br. J. Cancer, 76:1410,1997; Callagy G. et al., Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol., 8:104, 2000). Por otra parte, el VEGF también está dentro de grupo de factores solubles que, junto con otras citoquinas tales como IL-10, TNF- α y TGF- β (Ohm J.E. y Carbone D.P., Immunol. Res., 23:263, 2001), pueden estar implicados en la inmunosupresión que caracteriza a los pacientes con cáncer (Staveley K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:1178, 1998; Lee K.H. et al., J. Immunol., 161:4183, 1998). Este efecto inmunosupresor parece estar relacionado con su unión al receptor Flt1 (Gabrilovich D. et al., Blood, 92:4150, 1998).

La presente invención describe procedimientos de SAI en tumores experimentales que emplean moléculas de la familia de VEGF. Los efectos antitumorales obtenidos pueden basarse en al menos cuatro mecanismos diferentes, sin descartar sus posibles combinaciones: (a) destrucción directa del cáncer y de células estromáticas que producen VEGF, por linfocitos citotóxicos; (b) daños en las células endoteliales de los vasos asociados al tumor debido a la captura o la neutralización de VEGF circulante mediante anticuerpos; (c) destrucción directa de células endoteliales que expresan receptores de VEGF, por linfocitos citotóxicos o anticuerpos de fijación al complemento; (d) activación de una respuesta inmunológica local como consecuencia de la captura o la neutralización de VEGF circulante y la consiguiente eliminación de sus efectos inmunosupresores.

De manera ideal, estos tratamientos podrían utilizarse para disminuir o evitar la aparición de la metástasis, para reducir o eliminar tumores primarios como una primera o segunda línea de terapia, en combinación o no con otros agentes antitumorales.

La inmunización activa dirigida a la familia de VEGF y a sus receptores también podría ser eficaz para la terapia sencilla de procesos inflamatorios agudos y crónicos (asma, insuficiencia respiratoria, endometriosis, aterosclerosis, edema tisular), enfermedades infecciosas (hepatitis, sarcoma de Kaposi), enfermedades autoinmunitarias (diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, tiroiditis, sinovitis), retinopatías diabética y del recién nacido, rechazo al trasplante de órganos, degeneración macular, glaucoma neovascular, hemangioma, y angiofibroma, entre otros.

25 **Descripción detallada de la invención**

Según la presente invención, la administración *in vivo* de secuencias oligonucleotídicas que codifican proteínas de la familia de VEGF, así como sus variantes polipeptídicas, induce una respuesta inmunológica celular y humoral con efecto antiangiogénico y antitumoral.

Los inmunógenos de naturaleza polipeptídica de interés para la presente invención, así como sus fragmentos, pueden aislarse a partir de sus fuentes naturales u obtenerse mediante síntesis o tecnología de ADN recombinante. Estos polipéptidos también pueden producirse condensados a proteínas con actividad adyuvante reconocida, tal como p64K (R. Silva et al., documentos US 5286484 y EP 0474313), o pueden unirse covalentemente a ellas después de su obtención individual. Otra estrategia disponible en estos casos es la obtención del polipéptido natural, sus variantes modificados o mutados, y sus fragmentos, como parte de bucles expuestos o no expuestos en proteínas bacterianas, tales como OMP1, que son parte de preparaciones inmunoestimulantes, en este caso particular VSSP (R. Perez et al., documentos US 5788985 y 6149921). Además, es posible obtener el inmunógeno polipeptídico expuesto sobre la superficie de una partícula vírica (HbsAg, VP2 de parvovirus, etc.), unido a péptidos específicos que se dirigen a células u órganos especializados en la inducción de la respuesta inmunológica (CTLA4, segmento Fc de la Ig, etc.), o a proteínas capaces de aumentar la biodistribución, tales como VP22.

Las principales fuentes naturales de las proteínas de interés para la presente invención se expresan predominantemente en la placenta, en células endoteliales activadas, y en células tumorales. Se utiliza el ARNm de estas células o tejidos para obtener ADN complementario (ADNc) mediante procedimientos conocidos. El ARN extraído se utiliza como molde para la amplificación a través de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) del ADNc correspondiente al antígeno seleccionado. En cada caso, los cebadores empleados se diseñan según las características del vector en el que se va insertar el ADNc y según las secuencias previamente divulgadas de la proteína de interés. Como alternativa, las regiones codificadoras se amplifican en dos o más fragmentos solapantes. Estos fragmentos incluyen un sitio de acoplamiento común empleado para ensamblar el ADN intacto, comenzando con sus fragmentos.

Una alternativa para la clonación de los antígenos de interés es la selección a partir de bancos de ADN disponibles en el mercado derivados de endotelio humano, o a partir de tumores con este mismo origen. En algunos casos, puede resultar deseable mutar algunos de los antígenos objeto de la presente invención para evitar, en especial con la familia de VEGF, un acontecimiento de inducción de la angiogénesis producido por la vacunación. Estas mutaciones se realizan preferiblemente en los sitios de unión al receptor que ya han sido divulgados en la bibliografía. Para esto se diseñan cebadores que cubran ambos extremos de la molécula deseada, y se emplean los productos de la PCR como molde para obtener la molécula deseada. Estos variantes mutados carecen de actividad biológica pero reproducen las propiedades inmunogénicas del antígeno seleccionado.

Las moléculas de ADNc obtenidas mediante los procedimientos descritos anteriormente se administran en un vector apropiado, siendo éste un virus, un plásmido, un cromosoma artificial bacteriano o similares. El vector porta los elementos necesarios para la expresión adecuada del gen en las células diana, así como el resto de elementos que permiten que sea producido en el sistema celular hospedante según su naturaleza. Las moléculas de ADN de la presente invención pueden contener uno o más genes de interés, constituidos por uno o más ácidos nucleicos (ADNc, ADNg, ADN sintético o semisintético, o similar) que cuando se transcribe o se traduce (según sea apropiado) en células diana genera los productos con valor terapéutico/de vacuna.

En general, el gen del producto terapéutico de vacuna según la invención está bajo el control de un promotor transcripcional que es funcional en la célula diana o el organismo (mamíferos), así como una región del extremo 3' que contiene las señales necesarias para la terminación y la poliadenilación del ARNm del producto de interés, permitiendo su expresión. El promotor puede ser el promotor natural del gen, o un promotor heterólogo transcripcionalmente activo en la células diana. El promotor puede ser de origen eucariota o vírico. Entre los promotores eucariotas, es posible utilizar cualquier promotor o secuencia derivada que estimule o reprima la transcripción del gen, de manera específica o no específica, inducible o no inducible, de una manera fuerte o débil. Además, la región del promotor puede modificarse mediante la inserción de activadores o secuencias inductoras, permitiendo la expresión predominante o específica de tejido del gen en cuestión. Además, el gen de interés puede contener una secuencia señal para la localización subcelular, de modo que su localización celular o secreción pueda modificarse en la célula en la que se exprese, o en otro lado, tras haberse sintetizado. También puede contener una secuencia que codifique una región de unión específica a un ligando específico de un tejido inmunológico, dirigiéndose al sitio en el que se genera la respuesta, con la obtención del efecto terapéutico/de vacuna.

Además, el gen de interés puede estar precedido de la secuencia codificadora para la maquinaria de replicación del ARNm, de manera tal que el ARNm se amplifica en la célula diana, aumentando la expresión de dicho gen, y con ello, del efecto terapéutico/de vacuna según la invención. La maquinaria de replicación en cuestión puede ser de origen alfa-virus (Schlesinger S., Expert Opin. Biol. Ther., 1:177, 2001), de modo más específico derivada de los virus Sindbis o Semliki, o similares. En este caso concreto, el gen de interés está bajo el control transcripcional de un promotor subgenómico que permite la amplificación de su ARNm en células diana, una vez que las moléculas según la invención hayan sido internalizadas. Además, el vector de ADN puede contener secuencias que permitan la replicación de las moléculas objeto de la presente invención en células de mamífero. Esto permite un aumento en los niveles de expresión y/o del efecto terapéutico/de vacuna (Collings A., Vaccine, 18: 4601, 1999).

El vector de ADN puede purificarse utilizando técnicas convencionales para la purificación de ADN plasmídico. Estas técnicas incluyen el procedimiento de purificación mediante un gradiente de densidad de cloruro de cesio, en presencia de bromuro de etidio o, como alternativa, el uso de columnas de intercambio iónico o de cualquier otro intercambiador o procedimiento para separar moléculas de ADN (Ferreira G.N. et al., Trends Biotechnol., 18:380, 2000).

La presente invención incluye el uso de vectores de ADN plasmídico, preferiblemente los de la familia PAEC de vectores compactos para la terapia génica y de inmunización de ADN en seres humanos (Herrera et al., Biochem. Biophys. Res. Commu., 279: 548, 2000). Esta familia comprende los vectores pAEC-K6 (nº de registro AJ278712), pAEC-M7 (nº de registro AJ278713), pAEC-Δ2 (nº de registro AJ278714), pAEC-SPE (nº de registro AJ278715) y pAEC-SPT (nº de registro AJ278716). Estos vectores contienen sólo los elementos esenciales para la expresión del producto de interés en células de mamífero, incluyendo células humanas, y una unidad de replicación en *Escherichia coli*. La unidad transcripcional está formada por el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (CMV), un sitio de multiclonación versátil para la inserción del producto de interés, y las secuencias para la terminación transcripcional y la poliadenilación derivadas de virus de simio 40 (SV40). En la unidad de replicación, el vector contiene el gen para la resistencia a la kanamicina (Tn903), y un origen de la replicación de pUC19 (ColE1), para garantizar un alto número de copias y la selección de las bacterias que porten el plásmido de interés.

Además, la presente invención incluye el uso de vectores de ADN plasmídico, preferiblemente los de la familia PMAE de vectores compactos para la inmunización de ADN en seres humanos. Éstos contienen los mismos elementos funcionales en bacterias que la serie PAEC, así como el promotor inmediato temprano de CMV y el sitio de multiclonación. Además, portan un intrón sintético y una secuencia sintética para la terminación de la transcripción y la poliadenilación, derivadas de la β-globina de conejo. Se ha divulgado que, con secuencias similares a estas últimas, es posible obtener mayores niveles de expresión del gen clonado (Norman J.A. et al., Vaccine, 15: 801, 1997). Además, los vectores de esta serie incluyen repeticiones consecutivas de secuencias inmunoestimulantes (motivos CpG), que estimulan el sistema inmunológico innato en ratones y humanos, con la consecuente activación de una respuesta humoral y celular contra la molécula de interés (Krieg A.M., Vaccine, 19:618, 2001).

La inmunización con virus recombinantes (adenovirus, virus adenoasociados, vaccinia, virus de la varicela, virus de la viruela de los canarios, entre otros) produce una potente respuesta celular citotóxica en los hospedantes. Para introducir la secuencia de interés en el virus recombinante se emplean vectores que tienen secuencias de integración

5 y promotores que son particulares para cada tipo de virus. Esta estrategia también se incluye en el alcance de la presente invención, y se emplean preferiblemente el virus de la varicela y el vector pFP67xgpt. El vector pFP67xgpt se emplea para clonar genes bajo el control de un promotor temprano/tardío fuerte de naturaleza sintética entre los marcos de lectura abierta 6 y 7 de un fragmento de 11,2 kB BamHI del virus de la varicela FP9. Este plásmido también contiene el Ecogpt controlado por el promotor de vaccinia p7.5K, que se emplea para identificar virus recombinantes.

10 Otra alternativa a la presente invención consiste en la inmunización con proteínas de la familia de VEGF. Se clonan moléculas de ADNc, obtenidas como se describió previamente, en vectores para la expresión en virus, levaduras, fagos, plantas, o células superiores, para obtener los variantes de proteína de los antígenos, después de verificar su secuencia mediante los procedimientos tradicionales de secuenciación automática. Se han descrito y utilizado varios vectores para la expresión, para la obtención de proteínas recombinantes. Estos vectores contienen, al menos, una secuencia que controla la expresión unida operativamente a la secuencia del ADN o del fragmento que se va a expresar. Los ejemplos de secuencias útiles para el control de la expresión son los sistemas lac, trp, tac, y trc, las regiones de promotores y el operador principal del fago lambda, la región controladora de la proteína de la superficie fd, los promotores glicolíticos de levadura (por ejemplo, la 3-fosfoglicerato quinasa), los promotores de la fosfatasa ácida de levadura (por ejemplo, Pho5), los promotores de levadura para el factor alfa de apareamiento, y los promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus, virus de simio (por ejemplo, los promotores tempranos/tardíos de SV40), y otras secuencias conocidas que regulan la expresión de genes en células procariotas y eucariotas, sus virus, y sus combinaciones.

20 Los hospedantes utilizados para la replicación de estos vectores y la obtención de las proteínas recombinantes objeto de la presente invención incluyen células procariotas y eucariotas. Las células procariotas comprenden *E. coli* (DHI, MRCI, HB101, W3110, SG-936, X1776, X2282, DH5a), *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, y otras. Las células eucariotas incluyen levaduras y hongos, células de insecto, células animales (por ejemplo COS-7 y CHO), células humanas y células vegetales, y cultivos de tejidos, entre otras. Después de la expresión en el sistema elegido en un medio adecuado, los polipéptidos o los péptidos pueden aislarse mediante procedimientos conocidos.

Uso de adyuvantes

30 Aunque la vacunación con ADN desnudo o proteína ha demostrado ser eficaz en ciertos modelos animales, los pacientes afectados por tumores o enfermedades autoinmunitarias presentan un desafío a la estrategia terapéutica propuesta por la presente invención. Para favorecer la respuesta inmunológica, las vacunas de ADN o de proteínas pueden combinarse con inmunopotenciadores que ya han sido descritos, tales como sales minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio); inmunoestimulantes, tales como citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-18), moléculas (por ejemplo, CD40, CD154, cadena invariable de MHC de tipo I, LFA3); saponinas (por ejemplo, QS21), derivados de MDP, oligos de CpG, LPS, MPL y polifosfatos; partículas lipídicas, tales como emulsiones (por ejemplo, Freund, SAF, MF59), liposomas, virosomas, ISCOM, coquelantes; adyuvantes de micropartículas, tales como micropartículas de PLG, poloxámeros de tipo vírico (por ejemplo, HBcAg, HCcAg, HBsAg) y de tipo bacteriano (es decir, VSSP, OPC); y adyuvantes mucosícos, tales como la enterotoxina termolábil (LT), la toxina del cólera, y toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 y LTR72), micropartículas y liposomas polimerizados. En el caso de la vacunación de ADN, la expresión del antígeno de interés puede combinarse con algunas de las moléculas de inmunopotenciador que ya han sido mencionadas, sobre un vector bicistrónico.

40 Las situaciones experimentales detalladas en los ejemplos demuestran que el ADN puede acoplarse de una manera no covalente a algunas de las partículas mencionadas y que el uso de estas mezclas reduce la concentración óptima para obtener una respuesta antitumoral, similar a la descrita para dosis mayores de ADN desnudo.

Administración a un mamífero

Para las aplicaciones terapéuticas, las preparaciones de vacuna de la presente invención se administran a un mamífero, preferiblemente a un ser humano, en una dosis farmacéuticamente aceptable, mediante las siguientes vías: mucósica, subcutánea, intramuscular, peritoneal, intralinfática, tópica, y mediante inhalación, entre otras. Pueden administrarse en el espacio intersticial de tejidos, incluyendo músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, médula ósea, bazo, timo, corazón, nódulos linfáticos, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vejiga, estómago, intestino, testículos, ovario, útero, recto, ojo, glándulas, y tejido conectivo. En el caso de vectores para la transferencia de oligonucleótidos, su expresión se dirige preferiblemente a células diferenciadas somáticas, aunque pueden dirigirse a células no diferenciadas o menos diferenciadas, tales como fibroblastos de la piel y células pluripotenciales sanguíneas.

5

10

La dosis del inmunógeno puede administrarse en vehículos farmacéuticamente aceptados sin toxicidad ni efectos terapéuticos. Los ejemplos de estos vehículos incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearatos de aluminio, lecitina, proteínas séricas tales como albúmina, disoluciones tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos saturados de origen vegetal, agua, sales, o electrolitos tales como sulfato de protamina, bifosfato de sodio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias con base de celulosa y polietilenglicol. En la presente invención, se emplean preferiblemente tampones fosfato como vehículos para la preparación de vacunas.

15

En el caso del uso de proteínas y péptidos, éstos pueden conjugarse de manera covalente o no covalente a moléculas conocidas como vehículo que actúen como adyuvantes. Entre estas moléculas se encuentran KLH, p64K, OPC (Musacchio A. et al., Vaccine, 19; 3692, 2001), y VSSP. La combinación de ADN desnudo, vectores víricos, e inmunógenos de proteínas es una alternativa que también se incluye dentro del alcance de la presente invención.

20

De una manera ventajosa, la administración de ADN plasmídico permite la generación de formulaciones con una o más moléculas de interés en la preparación de vacunas. Por tanto, las moléculas según la presente invención pueden administrarse en programas de vacunas mediante la combinación de diferentes tipos de vectores (variante de reestimulación de inducción, con ADN, proteínas, vectores víricos).

25

Los vectores de ADN pueden administrarse directamente al paciente, o pueden modificarse células hospedantes *in vivo* o *ex vivo* con estos vectores. Esta última estrategia puede combinarse con la inserción mediante recombinación específica de sitio o una inmunización mediante transgénesis somática que dirige la expresión del vector a células específicas. Además, pueden utilizarse hospedantes bacterianos de vectores de ADN como sus vehículos de transferencia *in vivo*.

30

De esta forma, las moléculas que portan los genes según la presente invención pueden utilizarse en forma de ADN desnudo, o en combinación con diferentes vectores: químicos/bioquímicos/biológicos, naturales/sintéticos o recombinantes. Estas moléculas pueden acoplarse o combinarse con péptidos catiónicos, moléculas compactadoras (por ejemplo, PEG, PEI), péptidos de localización nuclear (NLP), etc. Estas también pueden administrarse junto con cationes capaces de formar precipitados de ADN, como parte de preparaciones liposómicas a las cuales las moléculas se han añadido previamente a la fusión de las membranas, y en vectores sintéticos de naturaleza lipídica, o formados por polímeros catiónicos (por ejemplo, DOGS o DOTMA). Para la administración de los vectores de ADN también pueden utilizarse proteínas quiméricas capaces de compactar el ADN y de mediar en el transporte del complejo formado, y su endocitosis selectiva por células específicas. Las moléculas de ADN que portan los genes terapéuticos/de vacuna según la invención pueden utilizarse para la transferencia genética a células utilizando procedimientos físicos de transferencia, tales como bombardeo de partículas, electroporación (*in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*), o directamente *in vivo* mediante aplicación tópica, inhalación mediante particulación, etc. Los vectores vivos incluyen partículas adenovíricas, o los mismos hospedantes en los que se han generado las moléculas según la presente invención.

35

40

La dosis de polipéptidos y/u oligonucleótidos que se va a utilizar puede ser establecida según diferentes parámetros, en particular dependiendo del gen o la proteína administrados como inmunógeno, la vía de administración, la patología que se va a tratar, el periodo de tratamiento y, en el caso de utilizar oligonucleótidos, del vector utilizado para la inmunización. Un cambio en el programa de dosis o la vía de administración diferente a los descritos en los siguientes ejemplos no se separa del principio o del precepto de la presente invención, siendo posible lograr una optimización de los programas de inmunización para obtener una mejor respuesta.

45

50

Usos terapéuticos

La presente invención tiene ventajas frente a la inmunoterapia pasiva, que está en fases avanzadas de ensayos clínicos que emplean las mismas moléculas como diana. En comparación con la transferencia pasiva de inmunidad a través de la administración de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anti-VEGF), la inmunización, con la proteína o con el oligonucleótido, tiene la ventaja de inducir la producción endógena de anticuerpos y, además, la proliferación y

la expansión de linfocitos CD8+ citotóxicos específicos.

La presente invención tiene ventajas frente a las estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear el sistema VEGF-VEGFR principalmente porque estas estrategias sólo disminuyen los niveles de VEGF circulante o bloquean al KDR. La estrategia propuesta, además de lograr los efectos mencionados, también destruye la fuente de VEGF (es decir, las células tumorales y el estroma asociado) y/o las células que expresan sus receptores (endotelio tumoral y algunas células tumorales). Un trabajo previo realizado en esta área sólo describe una respuesta humoral como principal componente del efecto observado. Sin pretender limitar el alcance de la presente invención a un mecanismo concreto, los ejemplos demuestran que, además de la respuesta específica humoral, las composiciones de vacunas son capaces de provocar una respuesta celular CD8+ que coopera con la respuesta humoral; y que, en un contexto tumoral, la combinación de ambas resulta importante para obtener un efecto antitumoral, habiéndose observado esto en el ejemplo 9.

Es posible que la respuesta celular citotóxica esté mediada por el reconocimiento de algunos de los péptidos que aparecen en las tablas 1 y 2; en éstas, para proporcionar antecedentes de la invención aparecen algunos segmentos peptídicos que podrían ser importantes en la respuesta celular dirigida contra dianas seleccionadas en la familia de VEGF. Esta información se obtuvo a través de análisis con ordenador de bases de datos públicas del NIH y del Heidelberg Institute (http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind, y www.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm) utilizando los programas informáticos BIMAS y SYFPHEITI, respectivamente. Los péptidos marcados y otras secuencias derivadas de los antígenos de interés pueden utilizarse para la inmunoterapia activa de las patologías descritas anteriormente, como un tratamiento individual o combinado, y como parte o no de moléculas con capacidades adyuvantes. Estos péptidos también podrían utilizarse como sus variantes oligonucleotídicos con objetivos de vacuna.

Los procedimientos para inhibir la angiogénesis y los trastornos patológicos asociados con este acontecimiento comprenden la administración de una cantidad eficaz del ADN o de proteínas de algunas de las moléculas descritas en esta invención, mediante cualquiera de las vías, y con el uso de algunos de los inmunopotenciadores o adyuvantes descritos previamente, a un mamífero. Este mamífero preferiblemente es un ser humano.

Un aumento no reversible y no regulado de la angiogénesis se ha relacionado con un amplio grupo de enfermedades. El sistema que comprende la familia de VEGF se sobreexpresa en muchos de estos trastornos patológicos, tal como se ha descrito previamente. De esta forma, las estrategias terapéuticas propuestas por la presente invención son eficaces para el tratamiento (a) del cáncer (tumores primarios y sus metástasis); (b) de procesos inflamatorios agudos y crónicos, tales como asma, insuficiencia respiratoria, endometriosis, aterosclerosis, y edema tisular; (c) de enfermedades de origen infeccioso, tales como hepatitis y sarcoma de Kaposi; (d) de enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, tiroiditis; y (e) de otras enfermedades y estados, tales como retinopatías diabéticas y del recién nacido, rechazo al trasplante de órganos, degeneración macular, glaucoma neovascular, hemangioma, y angiofibroma.

En particular en el caso del cáncer, la vacunación con los inmunógenos propuestos por la presente invención resulta eficaz para el tratamiento de carcinomas, sarcomas y tumores vascularizados. Algunos ejemplos de tumores que pueden tratarse con las estrategias propuestas incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como de cabeza y cuello, y tumores colorrectales, de próstata, de mama, de pulmón (incluyendo microcíticos y no microcíticos), de páncreas, de tiroides, de ovario y de hígado. Estos procedimientos también son eficaces para el tratamiento de otros tipos de tumores, tales como el sarcoma de Kaposi, neoplasia del sistema nervioso central (neuroblastoma, hemangioma capilar, meningioma y metástasis cerebral), melanomas, carcinomas renales y gastrointestinales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma y leiomyosarcoma.

De modo específico, el uso de VEGF-A como inmunógeno es útil para el tratamiento de tumores de diferentes orígenes y localizaciones, y sus metástasis, del hemangioma, de la endometriosis, de edemas tisulares, de procesos inflamatorios crónicos, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, de la aterosclerosis, de la artritis reumatoide y de la osteoartritis, de artropatías inflamatorias, de la psoriasis, de la insuficiencia respiratoria, del asma, de la tiroiditis, de las retinopatías diabéticas y del recién nacido, de la degeneración macular y del glaucoma, de la enfermedad de VHL autosómica, de la obesidad, y del rechazo a algunos trasplantes de órganos.

Los estudios basados en la inmunoterapia pasiva mediante la administración de anticuerpos han demostrado que la combinación de anticuerpos frente a VEGF-A y KDR es más eficaz en modelos de tumores singéneos. Además, las composiciones de vacunas de la invención pueden utilizarse junto o de manera secuencial con fármacos o agentes quimioterapéuticos, que pueden ser beneficiosos para el trastorno que se está tratando.

Los resultados descritos a continuación demuestran que las respuestas antiangiogénica y antitumoral están mediadas por una cooperación entre las respuestas humoral y celular. En particular, VEGF y su receptor están implicados en el proceso de maduración de las células dendríticas, y actúan sobre precursores de linfocitos B y T. El ejemplo 10 demuestra que la estrategia terapéutica propuesta, además de disminuir los niveles de VEGF en suero,

también contribuye a la normalización de las proporciones de linfocitos B y T, y de células dendríticas maduras. Este efecto favorece la presentación de antígenos tumorales dentro de un contexto de MHC I, mejorando la calidad y la intensidad de la respuesta antitumoral inmunológica dirigida no sólo al inmunógeno, sino también a otros antígenos asociados a tumores, específicos de tumores, y sobreexpresados, en un contexto tumoral.

Tabla 1. Estimación de los péptidos asociados a MHC1 de la familia de proteínas VEGF en el contexto de HLAA.0201

A.- Utilizando el programa informático BIMAS													
VEGF-A			VEGF-B			VEGF-C			VEGF-D			PIGF	
Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd
LLSWVHWSL	272	LLLAALLQL	309	YLSKTLFEI	640	FMMLYVQLV	1968	RLFPCFLQL	150				
ALLLYLHHA	42	QLAPAQAPV	70	TLFEITVPL	324	KLWRCRLRL	620	WSEYPSEV	42				
WSLALLLYL	30	QLVPSCVTV	70	VLYPEYWKM	304	QLFEISVPL	324	VMRLFPCFL	42				
FLQHNKCEC	23	LMGTVAKQL	26	CMNTSTSYL	85	YISKQLFEI	88	RALERLVDV	34				
WVHWSLALL	20	LLAALLQLA	19	KLFPSCCGA	64	CMNTSTSYI	41	VELTFSQHV	32				
FLLSWVHWS	16	LLQLAPAQA	8	LLGFFSVAC	32	VLQEENPLA	35	AVPPQQQWAL	14				
RQLELNERT	6	VVSWIDVYT	6	SLPATLPQC	11	WVVVNVFMM	27	LQLLAGLAL	14				
NITMQIMRI	3	CVPTGQHQV	6	GLQCMNTST	7	VNVFMMLYV	10	RSGDRPSYV	10				
YCHPIETLV	2	KQLVPSCVT	4	AAFESGLDL	4	SLICMNTST	7	LLAGLALPA	8				
IEYIFKPSC	2	VVPLTVEL	3	EQLRSVSSV	4	CVLQEENPL	7	CVPVETANV	6				
B.- Utilizando el programa informático SYFPEITHI													
VEGF-A			VEGF-B			VEGF-C			VEGF-D			PIGF	
Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.
LLSWVHWSL	24	LLLAALLQL	29	TLFEITVPL	27	FMMLYVQLV	25	ALERLVDW	26				
ALLLYLHHA	24	QLAPAQAPV	26	DLEEQLRSV	26	QLFEISVPL	25	RLFPCFLQL	24				
WVHWSLALL	20	QLVPSCVTV	26	YLSKTLFEI	26	YISKQLFEI	24	RALERLVDV	24				
SLALLLYLH	20	VVPLTVEL	24	ALLPGPREA	24	KLWRCRLRL	23	LLAGLALPA	22				
SYCHPIETL	19	LLRRLLAA	23	CMNTSTSYL	21	RAASSLEEL	22	LAGLALPAV	22				

NITMQIMRI	19	LLAALLQLA	23	DICGPNKEL	21	SLEELLRIT	22	VMRLFPCFL	20
FLLSWVHWS	18	FLRCQGRGL	22	AAAAFESGL	20	ATFYDIETL	22	CFLQLLAGL	20
WSLALLLYL	18	LTVELMGTV	21	AAFESGLDL	20	EISVPLTSV	22	QLLAGLALP	20
HPIETLVDI	18	LRRLLAAL	20	VLPEYWKM	20	SUCMNTST	20	SAGNGSSEV	20
CNDEGLECV	18	LMGTVAKQL	19	IIRSLPAT	20	VPLTSVPEL	20	VVSEYPSEV	20

Nota: los valores en negrita se corresponden con aquellos péptidos o sus regiones que coinciden en ambas predicciones.

Tabla 2. Estimación de los péptidos asociados a MHC1 de los receptores de la familia de VEGF en el contexto de HLA.A.0201

A.- Utilizando el programa informático BIMAS														
VEGFR-1			VEGFR-2			VEGFR-3			NRP-1			NRP-2		
Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	Secuencia	Kd	
FLYRDVTWI	1942	VLLWEIFSL	1792	VLLWEIFSL	1793	GLLRFVTAV	2249	VVMYDHAKWL	5121					
VLLWEIFSL	1792	SLQDQGDYV	769	RLLLEKSGV	1055	VLLGAVCGV	1006	ILQFIFDL	484					
KLLRGHTLV	901	VLLAVALWL	739	VLWPDGQEV	981	WMPENIRLV	436	YLQVDLRFL	247					
GLLTCEATV	257	AMFFWLLL	427	NLTDLLVNV	656	GILSMVFYT	278	ALYFSRHQV	223					
TLFWLLTL	182	VIAMFFWLL	270	KQAERGWV	557	LLCAVLALV	272	NMLGMLSGL	131					
ILLSENNVV	179	ILLSEKNVV	179	GVIAVFFWV	369	VLLHKSLKL	134	WLYTLDPIL	129					
TLNLTIMNV	160	LLAVALWLC	146	KLVIQNAV	243	GMLGMVSGL	131	DIWDGIPHV	56					
CVAATLFWL	137	KNLDTLWKL	128	ALWNSAAGL	177	FQLTGGTTV	120	KMEIILQFL	44					
LLSIKQSNV	118	AVIAMFFWL	113	TLSLIPRV	160	VLATEKPTV	118	VLNKLHAPL	36					
SLQDSGTYA	112	LLLVIILRT	108	SQHDLSYV	159	GPFLFIKVV	81	LLGATCAGL	36					
B.- Utilizando el programa informático SYFPEITHI														
VEGFR-1			VEGFR-2			VEGFR-3			NRP-1			NRP-2		
Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	Secuencia	Puntuac.	
TLFWLLTL	29	VLLWEIFSL	29	VLLWEIFSL	29	VLLGAVCGV	30	NMLGMLSGL	27					
VLLWEIFSL	29	LLVIILRTV	28	SIPGLNVTL	27	GLLRFVTAV	29	ILQFLIFDL	26					
ILPGSSTL	28	GLFCKTLTI	26	NLTDLLVNV	27	LLCAVLALV	28	DIWDGIPHV	26					
LLCALLSCL	27	SIMYIVVW	26	VLWPDGQEV	26	GMLGMVSGL	28	YLQVDLRFL	26					
GLLTCEATV	27	IILVGTAVI	26	LLPRKSLEL	26	ALGVLLGAV	28	TLDPILITI	26					

LLRGHTLVL	27	ALMSELKIL	26	ALWNSAAGL	26	VLLHKSLKL	27	ILAKPKMEI	25
ALMTELKIL	26	AASVGLPSV	25	IMDPGEVPL	26	VLATEKPTV	26	VLNKLHAPL	25
KLLRGHTLV	25	SISNLNVSL	25	RLWLCLGLL	25	QLTGGTTVL	25	LLGATCAGL	25
TLNLTIMNV	25	AMFFWLLLV	25	LIYFYVTTI	25	VLLGAVCGV	30	ALYFSRHHQV	23
ILLSENNVV	25	ILLSEKNW	25	LLEGQPVLL	25	GLLRFVTAV	29	GIGMRLEVL	23

Nota: los valores en negrita se corresponden con aquellos péptidos o sus regiones que coinciden en ambas predicciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Los ejemplos 1, 2 y 4 proporcionan detalles de la invención, y los ejemplos 3 y 5 a 11 proporcionan antecedentes generales de la invención.

5 Clonación y expresión transitoria de los antígenos

VEGF humano, sus isoformas y mutantes funcionales

Las isoformas de VEGF se clonaron aplicando una reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde un ADNc obtenido a partir del aislamiento previo de ARNm de la línea celular CaSki (ATCC CRL 1550), según las instrucciones del fabricante (Perkin-Elmer), y utilizando los cebadores SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Las bandas que se corresponden con los productos de la amplificación de las isoformas de VEGF 121, 165 y 189 se extrajeron de geles de agarosa al 2%. Después de la digestión de las bandas con las endonucleasas BamHI y EcoRI, los ADNc de las isoformas de VEGF se purificaron y se clonaron independientemente en el vector PAC Δ 2 (vector propiedad de CIGB). Los plásmidos resultantes se secuenciaron y se determinó que no tenían mutaciones con respecto a las secuencias de aminoácidos indicadas por el EMBL (www.embl-heidelberg.de) para las isoformas clonadas. El ADNc que se corresponde con las isoformas de VEGF posteriormente se clonó con KpnI/EcoRV en el vector pMAE5 Δ 5, que entre otras características se diferencia del pAEC Δ 2 por la presencia de cinco sitios CpG inmunoestimulantes.

El ADNc procedente de un variante de VEGF deficiente para la unión al receptor KDR (VEGF_{KDR(-)}) se obtuvo mediante mutagénesis directa de la isoforma VEGF₁₂₁ previamente clonada, según se describe en Siemeister G. et al. (Siemeister G. et al., J. Biol. Chem., 273:11115, 1998).

20 El variante mutado se generó mediante PCR utilizando los siguientes cebadores:

(A) Amplificación del fragmento 5'-terminal (315 pb): utilizando cebadores con las secuencias SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4;

(B) Amplificación del fragmento 3'-terminal (93 pb): utilizando cebadores con las secuencias SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.

25 Los fragmentos amplificados de esta forma se purificaron como se ha indicado, y se utilizaron en concentraciones equimolares como molde para una PCR de fusión utilizando los cebadores correspondientes a las secuencias SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. El ADNc resultante que contenía la mutación se digirió con BamHI/EcoAI, y se purificó y se clonó en el vector pAEC Δ 2. Las mutaciones introducidas se comprobaron mediante secuenciación, y el ADN correspondiente a VEGF_{KDR(-)} se subclonó con KpnI/EcoRV en el vector pMAE5 Δ 5, dando como resultado pMAE5 Δ 5 VEGF_{KDR(-)}.

30 Los plásmidos utilizados en la transfección y en la vacunación de animales se purificaron en condiciones exentas de endotoxinas, según se describe en Whalen R. et al. (Whalen R.G. y Davis H.L., Clin. Immunol. Immunopathol., 75:1, 1995). Brevemente, el ADN se purificó utilizando sistemas exentos de endotoxinas QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante, y el ADN después se sometió a una segunda precipitación. Por último, el ADN se disolvió en PBS exento de endotoxinas (SIGMA, EEUU) hasta una concentración final de 4 mg/ml.

1.2 Receptor de VEGF humano (KDR/Flk1)

Los ADNc que codifican el dominio extracelular del receptor KDR de VEGF (KDR1-3) y los dominios transmembrana e intracelular de este receptor (KDR TC) se obtuvieron a partir de una RT-PCR utilizando ARNm de la línea de células endoteliales HUVEC (Clonetic, EEUU), tratada con VEGF humano (Sigma) y heparina (Sigma).

40 En el caso de los dominios extracelulares 1 a 3, los cebadores utilizados se corresponden con las secuencias SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10. Después de la digestión del fragmento amplificado (943 pb) con las endonucleasas BamHI y EcoRI, el ADNc que codifica los dominios 1-3 de KDR se purificó y se clonó en el vector pAEC Δ 2. Los clones positivos por un análisis de restricción se verificaron mediante la secuenciación del correspondiente ADN. El ADNc correspondiente a KDR 1-3 entonces se subclonó con KpnI/EcoRV en el vector pMAE5 Δ 5 previamente descrito (pMAE5 Δ 5 KDR1-3).

45 Para la clonación de las regiones transmembrana y citosólica del receptor se diseñó una estrategia en dos etapas. Para la inserción del primer segmento, se utilizaron los cebadores correspondientes a SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12. Después de una digestión con XbaI/BglII de este segmento de 747 pb, el producto se clonó en el vector pMAE5, previamente digerido con las mismas enzimas, obteniendo el plásmido pMAE5 KDR 747. Este plásmido se digirió con BglII/NotI para insertar el restante fragmento carboxi-terminal de 1091 pb que se amplificó utilizando los cebadores correspondientes a las secuencias SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14. Los clones positivos por análisis de

restricción se verificaron mediante secuenciación de ADN y se denominaron pMAE5 KDR C.

1.2.1 Clonación de las regiones transmembrana y citosólica de KDR en un vector vírico

5 Para la clonación de las regiones transmembrana y citosólicas de los receptores de VEGF (KDR) en el virus de la varicela se emplearon los cebadores correspondientes a las secuencias SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16. Después de digerir este segmento de 953 pb con las enzimas *StuI*/*SmaI*, el producto se clonó en el vector pFP67xgpt, previamente digerido con las mismas enzimas. En este mismo vector, digerido con *SmaI*/*BamHI*, se insertaron las 919 pb restantes, que se amplificaron a partir del ADNc original utilizando cebadores correspondientes a las secuencias SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO:18. Los clones positivos por análisis de restricción se verificaron mediante secuenciación de ADN y se denominaron pFP67xgpt KDR C.

10 El virus de la varicela (FWPV) se replicó en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 2%. El pFP67xgpt KDR C se transfectó utilizando lipofectina (Gibco BRL, Grand Island, EEUU) en CEF previamente infectado con la cepa atenuada FP9. Después de 24 horas se añadió medio fresco y las células se cultivaron durante otros 3 a 4 días. Después de este tiempo, las células se congelaron-descongelaron tres veces. Los virus recombinantes que expresan el gen que codifica la enzima *Ecogpt* se purificaron en medio selectivo con ácido micofenólico (25 µg/ml), xantina (250 µg/ml) e hipoxantina (15 µg/ml) (MXH). La correcta inclusión del gen en los virus recombinantes se comprobó mediante PCR. Los virus recombinantes se denominaron FPKDRgpt, y los no recombinantes se utilizaron como FP de control negativo.

Ejemplo 2

Expresión *in vivo* de antígenos

20 Para confirmar el potencial de las construcciones fabricadas para que expresen las proteínas *in vivo*, éstas se inyectaron en el músculo cuádriceps femoral de ratones C57BL6 (3 por grupo).

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (10 y 50 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

2. pMAE5Δ5-VEGF₁₆₅ (10 y 50 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

3. pMAE5Δ5-VEGF₁₈₉ (10 y 50 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

25 4. pMAE5Δ5-VEGF_{KDR(-)} (10 y 50 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

5. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (10 y 50 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

6. pMAE5 KDR C (10 y 50 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

7. FPKDRgpt (2,5*10⁷ cfu) en PBS, pH 7,2.

8. PBS, pH 7,2 (control negativo).

30 A las 48 horas después de la inyección, los animales se sacrificaron y los músculos inyectados se extrajeron de una pieza. Una parte del tejido muscular se homogeneizó en presencia de inhibidores de proteasas y detergentes no iónicos. La presencia de VEGF en los extractos de proteínas se analizó mediante transferencia por puntos y transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce todas las isoformas de VEGF humano (sc-152G), siguiendo los procedimientos descritos. El ARN se extrajo a partir del resto del tejido muscular utilizando el reactivo TRI (SIGMA). Un total de 20 µg de ARN de cada situación experimental se sometió a una electroforesis en geles de agarosa al 1% que contenían formaldehído. El ARN se trasladó a un filtro de nailon (HYBOND) y se hibridó con el ADNc de la isoforma VEGF 121 marcada con ATP³², que reconoce las isoformas de VEGF, o con el ADNc de KDR marcado de forma similar. En ambos casos, los filtros se rehibridaron con el ADNc correspondiente a un gen constitutivo: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En todas las construcciones analizadas se identificaron bandas correspondientes a VEGF humano y a los fragmentos clonados del receptor KDR.

Ejemplo 3

Experimentos de protección *in vivo* que emplean una vacunación con el plásmido que contiene los fragmentos del gen de KDR, el receptor de VEGF

Grupos de 10 ratones C57BU6 se vacunaron o no se vacunaron con los siguientes variantes:

45 1. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

2. pMAE5 KDR C (1, 10, 50 y 100 µg/ratón) en PBS, pH 7,2.

3. FPKDRgpt ($2,5 \cdot 10^7$ cfu).

4. PBS, pH 7,2 (control negativo).

5. FP ($2,5 \cdot 10^7$ cfu) (control negativo del grupo 3).

- 5 En cada caso, los ratones se inmunizaron mediante una inyección intramuscular (i.m.) en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 μ l. Todos los animales se reinmunizaron 15 días después utilizando el régimen de inmunización original. La exposición al tumor se desarrolló 30 días después de la última inmunización, mediante una inyección subcutánea (s.c.) de 10^4 células de melanoma B16-F10 (ATCC CRL-6475) en la zona ventral derecha de cada animal. El crecimiento tumoral se controló con tres mediciones semanales hasta que los animales empezaron a morir.
- 10 En ratones inmunizados con el plásmido pMAE5 Δ 5-KDR 1-3 se evidenció una reducción en el tamaño de los tumores a dosis de 50 y 100 μ g de ADN/ratón, significativamente menor con respecto al control negativo (tabla 3). Un análisis de la supervivencia en el día 33 reveló un incremento significativo (con respecto al control negativo) de este parámetro para los animales inmunizados con dichas dosis de ADN de 50 y 100 μ g por ratón, con respecto a los ratones no inmunizados (grupo PBS, pH 7,2). En el caso de pMAE5 Δ 5-KDR C (tabla 3), se observó una significativa
- 15 reducción en el volumen tumoral en las cuatro dosis utilizadas, con un incremento en la supervivencia para dosis de 100 a 10 μ g/animal. El uso de vectores víricos reduce el volumen y aumenta la supervivencia en la condición utilizada para la construcción de FPKDRgpt (tabla 3), en comparación con el respectivo control negativo (grupo de ratones inmunizados con el vector sin el inserto FPgpt).

Tabla 3

Volumen tumoral y supervivencia en ratones inmunizados con los fragmentos del gen del receptor de VEGF (KDR).			
Grupo	[μ g de ADN]	Vol. tumoral (mm^3) en el día 24	Supervivencia (día 43)
pMAE5 Δ 5-KDR 1-3	100	424,0 \pm 199,2 (***)	(***)
	50	756,32 \pm 435,9 (***)	(**)
	10	1024,2 \pm 397,1 (*)	(ns)
	1	1334,2 \pm 620,7 (ns)	(ns)
pMAE5 Δ 5-KDR C	100	404,23 \pm 200,0 (***)	(**)
	50	633,2 \pm 365,2 (***)	(***)
	10	924,3 \pm 437,1 (**)	(*)
	1	1114,2 \pm 665,7 (*)	(ns)
FPKDRgpt	$2,5 \cdot 10^7$ cfu	304,23 \pm 152,0 (***)	(***)
FPgpt	$2,5 \cdot 10^7$ cfu	1891,0 \pm 726,0 (ns)	(ns)
PBS, pH 7,2	-	1785,0 \pm 826,0	-

Nota: el volumen tumoral se indica como media \pm desviación estándar (DE) de las mediciones realizadas en los animales de cada grupo; las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando ANOVA de una vía y un postensayo de Bortferroni. En el caso de supervivencia, la significancia estadística indicada se obtuvo utilizando el ensayo de rangos logarítmicos para comparar cada grupo con respecto al grupo control en el día indicado. La significancia estadística se indica como ns, $p \leq 0,05$ no significativo;
 *, $p \leq 0,05$;
 **, $p \leq 0,01$; y
 ***, $p \leq 0,001$.

Ejemplo 4**Experimentos de protección *in vivo* que emplean una vacunación con los plásmidos que contienen las isoformas de VEGF, y el variante mutado**

Grupos de 10 ratones C57BU6 se vacunaron o no se vacunaron con los siguientes variantes:

1. pAECΔ2-VEGF₁₂₁ (1, 10, 50 y 100 μg/ratón) en PBS, pH 7,2.
 - 5 2. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10, 50 y 100 μg/ratón) en PBS, pH 7,2.
 3. pMAE5Δ5-VEGF₁₆₅ (1, 10, 50 y 100 μg/ratón) en PBS, pH 7,2.
 4. pMAE5Δ5-VEGF₁₈₉ (1, 10, 50 y 100 μg/ratón) en PBS, pH 7,2.
 5. pMAE5Δ5-VEGF_{KDR(-)} (1, 10, 50 y 100 μg/ratón) en PBS, pH 7,2.
 6. PBS, pH 7,2 (control negativo).
- 10 En cada caso, los ratones se inmunizaron mediante una inyección intramuscular en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 μl. Todos los animales se reinmunizaron 15 días después utilizando el régimen de inmunización original. La exposición al tumor se desarrolló 30 días después de la última inmunización, mediante una inyección subcutánea de 10⁴ células de melanoma B16-F10 (ATCC CRL-6475) en la zona ventral derecha de cada animal. El crecimiento tumoral se controló con tres mediciones semanales hasta que los animales empezaron a morir.
- 15 Para el variante de ADN desnudo en la serie pAEC en el caso de ratones inmunizados con 100 μg/animal, se observó una disminución en el crecimiento tumoral con respecto al control negativo (tabla 4). En los variantes incluidos en el vector de la serie pMAE5Δ5 con 5 sitios CpG, independientemente de la isoforma de VEGF, el tamaño tumoral se redujo significativamente, comparado con el control negativo, en los grupos de ratones inmunizados con dosis de 10, 50 ó 100 μg de ADN. En el caso en que se utilizó el variante mutado pMAE5Δ5-VEGF_{KDR(-)}, se obtuvo una reducción significativa en el tamaño tumoral a dosis similares a las empleadas con el
- 20 pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁. Un análisis de la supervivencia en el día 43 evidenció un aumento significativo (con respecto al control negativo) de los animales inmunizados con los variantes pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁, pMAE5Δ5-VEGF₁₆₅, pMAE5Δ5-VEGF₁₈₉, y pMAE5Δ5-VEGF_{KDR(-)}, a dosis de 50 y 100 μg por animal (tabla 4).

Tabla 4

Volumen tumoral y supervivencia en ratones inmunizados con diferentes variantes de ADN desnudo que contiene las diferentes isoformas del gen VEGF y un variante mutado.			
Grupo	[μg de ADN]	Vol. tumoral (mm ³) en el día 24	Supervivencia (día 43)
pAECΔ2-VEGF ₁₂₁	100	991,5 ± 354 (*)	ns
	50	1429,2 ± 396 (ns)	ns
	10	1506,6 ± 442 (ns)	ns
	1	1660,5 ± 456 (ns)	ns
pMAE5Δ5-VEGF ₁₂₁	100	645,0 ± 215 (***)	***
	50	850,1 ± 463 (***)	***
	10	992,1 ± 410 (*)	ns
	1	1560,3 ± 598 (ns)	ns
pMAE5Δ5-VEGF ₁₆₅	100	799,2 ± 335 (***)	***
	50	916,6 ± 390 (**)	**
	10	1000,5 ± 662 (*)	ns
	1	1845,3 ± 450 (ns)	ns
pMAE5Δ5-VEGF ₁₈₉	100	790,1 ± 235 (***)	***

	50	996,5 ± 255 (**)	**
	10	1050,2 ± 362 (*)	ns
	1	1670,2 ± 408 (ns)	ns
pMAE5Δ5-VEGF _{KDR(-)}	100	550,1 ± 335 (***)	***
	50	894,7 ± 408 (**)	***
	10	991,8 ± 362 (*)	ns
	1	1489,3 ± 810 (ns)	ns
PBS, pH 7,2	0	1673,9 ± 712	

Nota: el volumen tumoral se indica como media ± desviación estándar (DE) de las mediciones realizadas en los animales de cada grupo; las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando ANOVA de una vía y un postensayo de Bortferroni. En el caso de supervivencia, la significancia estadística indicada se obtuvo utilizando el ensayo de rangos logarítmicos para comparar cada grupo con respecto al grupo control en el día indicado. La significancia estadística se indica como ns, p≤0,05 no significativo;
 *, p≤0,05;
 **, p≤0,01; y
 ***, p≤0,001.

Ejemplo 5**Experimentos de protección *in vivo* mediante una inmunización con pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ y pMAE5Δ5-KDR 1-3, en un modelo de artritis inducida por colágeno**

Grupos de 20 ratones se vacunaron o no se vacunaron con los siguientes variantes:

- 5 1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (50 μg de ADN/ratón) en PBS, pH 7,2.
2. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (50 μg de ADN/ratón) en PBS, pH 7,2.
3. PBS, pH 7,2 (control negativo).

En todos los casos, la inmunización (día 0) fue por vía intramuscular en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 μl. Todos los animales se reinmunizaron 15 días después utilizando el régimen de inmunización original.

- 10 En el día 5 comenzó la inducción de la artritis autoinmunitaria mediante la inmunización con colágeno de tipo II de pollo (Sigma), un modelo previamente descrito por Campbell et al. (Campbell I.K. et al., Eur. J. Immunol., 30:1568, 2000). Esta inmunización se repitió en el día 26. Las cuatro extremidades de cada ratón se evaluaron diariamente según el índice de artritis que establece una puntuación de 0 a 3 para cada extremidad debido a la presencia en el examen de señales de eritema (1), inflamación (2), o rigidez articular (3), con un valor máximo de 12. Los ratones comenzaron a mostrar síntomas clínicos del desarrollo de la artritis 23 días después de la inducción, con la mayor incidencia a los 50 días. La tabla 5 muestra el análisis de la incidencia de la artritis en los animales de diferentes grupos experimentales. En los días 40 y 55 se observó una significativa reducción en la incidencia de la artritis en los grupos vacunados (1 y 2), comparados con el grupo control.
- 15

Tabla 5

Incidencia de la artritis en días seleccionados (40 y 55)		
Grupo	Incidencia en el día 40	Incidencia en el día 55
1	20/8 (40%)	20/9 (45%)
2	20/6 (30%)	20/12 (60%)
3	20/10 (50%)	20/14 (70%)

Ejemplo 6**Efecto antiangiogénico *in vivo* de la vacunación**

Grupos de 15 ratones se vacunaron o no se vacunaron con los siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (50 μg de ADN/ratón) en PBS, pH 7,2.
2. pMAE5Δ5-KDR 1-3 (50 μg de ADN/ratón) en PBS, pH 7,2.
- 5 3. pMAE5Δ5-KDR C (50 μg/ratón) en PBS, pH 7,2.
4. PBS, pH 7,2 (control negativo).

En cada caso, los ratones C57B/6 se inmunizaron mediante una inyección intramuscular en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 μl. Todos los animales se reinmunizaron 15 días después utilizando el régimen de inmunización original. Treinta días después de la última inmunización se evaluó la angiogénesis *in vivo* en los animales utilizando Matrigel como se describe en Coughlin M.C. et al. (Coughlin M.C. et al., J. Clin. Invest., 101:1441, 1998). Los animales previamente vacunados se dividieron en grupos de 5 y se inyectaron por vía subcutánea en la línea media abdominal con 500 μl de Matrigel (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU), que contenía:

1. VEGF 50 ng/ml, heparina 50 U/ml.
- 15 2. 10⁵ células de melanoma B16-F10.
3. PBS.

Seis días después los animales se sacrificaron y se extrajo el tapón de Matrigel. Se analizó el contenido en hemoglobina en los tapones según las instrucciones del fabricante (kit de reactivo de Drabkin; Sigma Diagnostics Co., St. Louis, Missouri, EEUU).

20 La vacunación con los plásmidos que codifican VEGF o su receptor KDR inhibe significativamente ($p < 0,001$) la vascularización inducida por VEGF, así como la inducida por sistemas que son más complejos: células tumorales.

Ejemplo 7**Obtención de un inmunógeno basado en la unión no covalente de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ a diferentes agentes adyuvantes**

25 Se emplearon diferentes agentes inmunoestimulantes, previamente indicados, mezclados con la construcción de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ siguiendo la metodología descrita a continuación.

La proteína Opc de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* se purificó según el informe de Musacchio et al. (Musacchio A. et al., Vaccine, 67:751, 1997). Se añadieron 50 μg/ml de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ a 10 μg/ml de Opc con agitación suave a pH ácido. El complejo resultante se dializó a fondo durante la noche en PBS exento de endotoxinas, pH 7,2 (Sigma). Se comprobó el nivel de asociación de proteína Opc-ADN plasmídico (Opc-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁) mediante visualización de ADN utilizando un gel de agarosa al 1%. Más del 50% del ADN plasmídico se asoció a la proteína Opc.

35 Se emplearon partículas muy pequeñas (VSSP) del complejo de las proteínas de membrana externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis*, suministradas por the Center of Molecular Immunology (R. Pérez et al., solicitudes de patente de EEUU 5788985 y 6149921) para la combinación con el ADN plasmídico de interés. Las VSSP (1 mg) se incubaron con 5 mg de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ durante la noche con agitación suave. El material resultante se dializó a fondo en en PBS exento de endotoxinas, pH 7,2 (Sigma). Se comprobó el nivel de asociación de VSSP-ADN plasmídico (VSSP-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁) mediante visualización de ADN utilizando un gel de agarosa al 1%. Más del 50% del ADN plasmídico se asoció a las partículas VSSP.

40 Se produjeron antígenos nucleares de la hepatitis C y la hepatitis B en partículas (HCcAg y HBcAg) según un informe previo (Lorenzo L.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 281:962, 2001). Se mezcló 1 mg de los antígenos con 5 mg del plásmido en una incubación durante la noche. Los niveles de asociación de HCcAg- o HBcAg-ADN plasmídico (HCcAg-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ y HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁, respectivamente) se comprobaron mediante visualización de ADN utilizando un gel de agarosa al 1%. En cada caso, más del 50% del ADN se asoció a la partícula antigénica.

45

Ejemplo 8**Experimentos de protección *in vivo* con la construcción de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ y adyuvantes de la respuesta inmunológica**

Grupos de 10 ratones C57BL/6 se vacunaron o no se vacunaron con los siguientes variantes:

1. pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón) en PBS, pH 7,2.
- 5 2. Opc-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón).
3. VSSP-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón).
4. HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón).
5. HCcAg-pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ (1, 10 y 50 μg de ADN/ratón).
6. PBS, pH 7,2 (control negativo para el grupo 1).
- 10 7. Opc (control negativo para el grupo 2).
8. VSSP (control negativo para el grupo 3).
9. HBcAg (control negativo para el grupo 4).
10. HCcAg (control negativo para el grupo 5).

15 Los procedimientos de inmunización, así como la exposición al tumor y las mediciones del volumen tumoral fueron similares a las descritas en el ejemplo previo. Los variantes de vacuna con dosis similares o mayores que 10 μg de ADN/ratón disminuyeron el crecimiento tumoral, en comparación con los respectivos controles negativos (tabla 6). Se observó una supervivencia significativamente superior, comparada con el respectivo control, para los animales inmunizados con el gen VEGF, asociado o no asociado con Opc, VSSP, HCcAg y HBcAg, como vehículos inmunopotenciadores. Todos los variantes con vehículos mostraron una supervivencia significativamente superior
20 frente al respectivo control, para dosis que comienzan con 10 μg/ratón, mientras que el variante de ADN desnudo con el vector pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁ produjo unos resultados significativamente diferentes con respecto al control negativo a la dosis de 50 μg/ratón (tabla 6).

Tabla 6

Volumen tumoral y supervivencia de ratones inmunizados utilizando diferentes agentes inmunoestimulantes.			
Grupo	[μg de ADN]	Vol. tumoral (mm ³) en el día 24	Supervivencia (día 43)
pMAE5Δ5-VEGF	50	1050,9 ± 689 (**)	ns
	10	1229,0 ± 596 (*)	ns
	1	1895,3 ± 596 (ns)	ns
Opc-pMAE5Δ5-VEGF	50	960,6 ± 456 (**)	**
	10	1100,5 ± 615 (**)	*
	1	1654,8 ± 663 (ns)	ns
VSSP-pMAE5Δ5-VEGF	50	884,6 ± 410 (***)	**
	10	1002,3 ± 598 (**)	*
	1	1532,7 ± 745 (ns)	ns
HBcAg-pMAE5Δ5-VEGF	50	950,1 ± 570 (**)	**
	10	1230,5 ± 662 (*)	*
	1	1867,2 ± 652 (ns)	ns

HCCAg-pMAE5Δ5-VEGF	50	950,1 ± 570 (**)	**
	10	1230,5 ± 662 (*)	*
	1	1887,2 ± 652 (ns)	ns
Opc (5 μg/ratón/dosis)	5 μg	2059,0 ± 687 (ns)	ns
VSSP		2156,0 ± 759 (ns)	ns
HBcAg (5 μg/ratón/dosis)		1998,2 ± 798 (ns)	ns
HCCAg (5 μg/ratón/dosis)		1897,0 ± 812 (ns)	ns
PBS, pH 7,2		2073,0 ± 816 (ns)	ns

Nota: el volumen tumoral se indica como media ± desviación estándar (DE) de las mediciones realizadas en los animales de cada grupo; las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando ANOVA de una vía y un postensayo de Bortferroni. En el caso de supervivencia, la significancia estadística indicada se obtuvo utilizando el ensayo de rangos logarítmicos para comparar cada grupo con respecto al grupo control en el día indicado. La significancia estadística se indica como ns, p≤0,05 no significativo;
 *, p≤0,05;
 **, p≤0,01; y
 ***, p≤0,001.

Ejemplo 9

Experimento de protección *in vivo* utilizando VEGF en su forma de proteína

- 5 Grupos de 10 ratones C57BL/6 se vacunaron o no se vacunaron con los siguientes variantes: VEGF₁₆₅ (20 μg/ratón) con adyuvante de Freund completo e incompleto, adyuvante de Freund completo e incompleto (control negativo). El antígeno de VEGF₁₆₅ se obtuvo de una fuente comercial (SIGMA) con una pureza mayor que 97%. Los ratones se inmunizaron mediante la vía intraperitoneal utilizando adyuvante de Freund completo (Sigma), con reinmunizaciones en los días 15 y 30 mediante la misma vía pero utilizando adyuvante de Freund incompleto. La exposición al tumor y las mediciones del volumen tumoral fueron similares a las descritas en el ejemplo previo.
- 10 Se observó una reducción significativa en el volumen tumoral y una mayor supervivencia en el grupo inmunizado con VEGF, comparado con el grupo no inmunizado control. El efecto fue similar al encontrado en experimentos previos que emplean ADN de VEGF.

Ejemplo 10

Experimentos *in vivo* de transferencia de protección inmunológica en ratones C57BL/6 con inmunodeficiencia combinada grave (SCID)

- 15 Ratones C57BU6 se inmunizaron o no se inmunizaron con dosis de 50 μg de ADN de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁/ratón utilizando los procedimientos descritos en el ejemplo 5. Los ratones se sacrificaron a los 45 días después de la primera inmunización. Los linfocitos CD8+, CD4+ y B de estos ratones se separaron utilizando esferas magnéticas (Dynabeads, EEUU) según las instrucciones del fabricante.
- 20 Grupos de 10 ratones C57BL/6 SCID de seis semanas se reconstituyeron con las siguientes combinaciones de linfocitos previamente extraídos:
- Grupo 1: linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ procedentes de ratones inmunizados con ADN de pMAE5Δ5-VEGF₁₂₁. Los linfocitos B no se reconstituyeron.
- 25 Grupo 2: linfocitos B y linfocitos T CD4+ procedentes de ratones inmunizados, y linfocitos T CD8+ procedentes de ratones no inmunizados.
- Grupo 3: linfocitos B, linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ procedentes de ratones inmunizados, como control positivo del experimento.
- Grupo 4: linfocitos B, linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ procedentes de ratones no inmunizados, como control negativo del experimento.

Los ratones SCID reconstituidos se expusieron por vía subcutánea a 10^4 células de melanoma B16-F10. El crecimiento tumoral se controló mediante tres mediciones semanales hasta que los ratones comenzaron a morir. Se analizaron los niveles de anticuerpos anti-VEGF mediante un ELISA de laboratorio. Se incubaron placas de 96 pocillos durante la noche con una disolución 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de VEGF165 (Sigma). Los pocillos se bloquearon con una disolución de PBS-BSA al 1% (BDH, Reino Unido) y después se incubaron con diluciones en serie del suero de los animales. Después de lavar con PBS-Tween al 0,05% se añadió una IgG antirratón policlonal disponible en el mercado (Sigma, A0168). La señal se amplificó en presencia del sustrato comercial orto-fenilendiamina (OPD, Sigma). La tabla 7 refleja los resultados del volumen tumoral (día 24) y de la supervivencia (día 40) de grupos de ratones sometidos a una exposición al tumor. Comenzando en el día 15 después de la reconstitución, los animales de los grupos 1 a 3 experimentaron una reducción en el tamaño tumoral, comparado con el grupo 4, reconstituido con linfocitos procedentes de ratones no inmunizados. Por tanto, el efecto que provoca el sistema inmunológico en los ratones inmunizados, que permite la reducción en el tamaño tumoral, está relacionado con respuestas humorales y celulares, siendo estas últimas de tipo citotóxico (CTL) debido a la ausencia de anticuerpos anti-VEGF en el grupo 1. No obstante, en las condiciones experimentales utilizadas, la supervivencia sólo aumentó en el grupo 3 (linfocitos B y T de ratones inmunizados), comparado con el resto de los grupos (tabla 7). En los animales parcialmente reconstituidos, en los que los B o T de las respuestas de tipo CTL estaban ausentes (grupos 1 y 2, respectivamente), la supervivencia no se diferenció de la del control negativo. Estos resultados demuestran que la combinación de respuestas humoral y celular (grupo 4) tiene un efecto sinérgico que permite una respuesta eficaz capaz de prolongar la supervivencia de ratones sometidos a la exposición a un tumor.

Tabla 7

Volumen tumoral y supervivencia en ratones SCID reconstituidos con linfocitos procedentes de ratones inmunizados con pMAE5 Δ 5-VEGF ₁₂₁					
Grupo	Ratones donantes de linfocitos a C57BL6 SCID			Volumen tumoral (día 24)	Supervivencia (día 40)
	Linfocitos B	Linfocitos CD4+	Linfocitos CD8+		
1	-	inmunizados	inmunizados	1067,8 \pm 689 (ns)	ns
2	inmunizados	inmunizados	no inmunizados	1129,0 \pm 596 (ns)	ns
3	inmunizados	inmunizados	inmunizados	652,3 \pm 396 (***)	***
4	no inmunizados	no inmunizados	no inmunizados	1856,0 \pm 756	-

Nota: los ratones donantes se inmunizaron o no se inmunizaron con dosis de 50 μg de ADN de pMAE5 Δ 5-VEGF por ratón. El volumen tumoral se indica como media \pm desviación estándar (DE) de las mediciones realizadas en los animales de cada grupo; las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando ANOVA de una vía y un postensayo de Bortferroni. En el caso de supervivencia, la significancia estadística indicada se obtuvo utilizando el ensayo de rangos logarítmicos para comparar cada grupo con respecto al grupo control en el día indicado. La significancia estadística se indica como ns, $p \leq 0,05$ no significativo; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; y ***, $p \leq 0,001$.

Ejemplo 11

Demstración del restablecimiento inmunológico mediante la reducción de VEGF circulante a través de la respuesta inmunológica

Grupos de 15 ratones hembra C57BU6 se inyectaron por vía intramuscular con los siguientes variantes:

1. pMAE5 Δ 5-VEGF₁₂₁ (50 μg /ratón) en PBS, pH 7,2.
2. PBS, pH 7,2.

En cada caso, los ratones se inmunizaron mediante una inyección intramuscular en la pata trasera izquierda con un volumen total de 50 μl . Todos los ratones se reinmunizaron 15 días después utilizando el régimen de inmunización original. Treinta días después de la última inmunización se sacrificaron 5 animales seleccionados aleatoriamente de cada grupo, para analizar el estado inmunológico de los animales inmunizados y control, así como la toxicidad de la vacunación en órganos y tejidos, mediante evaluaciones macroscópicas e histológicas.

El resto de los animales en cada grupo recibieron una inyección subcutánea de 10^4 células de melanoma B16-F10 en la zona ventral derecha. En los días 15 y 30 después de la inyección de las células tumorales se sacrificaron 5 ratones por grupo y se evaluaron como se ha descrito previamente.

5 No se evidenciaron acontecimientos tóxicos a nivel macroscópico en ninguno de los animales evaluados, y el análisis histopatológico no reveló daños en ninguno de los órganos estudiados 30 días después de la última inmunización. La evaluación inmunológica consistió en: (1) evaluación de los niveles de VEGF murino en el suero; (2) contenido celular de linfocitos T y B, así como el grado de madurez de las células dendríticas en el bazo, y en los nódulos linfáticos inguinales y axilares braquiales.

10 El análisis de los niveles de VEGF murino (kit R&D para VEGF murino) en el suero de animales no tratados mostró que, a medida que aumentaba el tiempo de exposición al tumor, los niveles de VEGF aumentaban en el suero, en concordancia con el aumento en el tamaño tumoral con el tiempo. En el grupo inmunizado contra VEGF humano se detectó una significativa reducción ($p < 0,001$ ANOVA, postensayo de Bonferroni) en los niveles de VEGF murino, que duró pasados 30 días después de la exposición al tumor.

15 El estado del sistema inmunológico de los animales sacrificados en cada momento se analizó a través del estudio de las proporciones de las poblaciones celulares presentes en los nódulos linfáticos y en el bazo, según los informes de Gabrilovich et al. (Gabrilovich D. et al., Blood, 92:4150, 1998). Para estos estudios, se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales que reconocen moléculas de CD3, CD19, CD11c y CD86 (B7-2) (Pharmlingen) marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE), que permiten la visualización de las poblaciones celulares utilizando un citómetro de flujo (FACS). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

20 Tabla 8

Resumen de los resultados del análisis FACS de poblaciones celulares según los marcadores de la superficie.						
Grupo (día)	Total de células				Fracción enriquecida con células dendríticas	
	Nódulos linfáticos		Bazo		Nódulos linfáticos	Bazo
<u>A. No inmunizado</u>	CD-19	CD-3	CD-19	CD-3	CD-11c/B7-2	CD11c/B7-2
No inmunizado (30 días)	8%	86%	38,1%	40,8%	60%	62,4%
Después de la exposición al tumor (60 días)	20,1%	60,5%	3,8%	11,4%	32,8%	10,2%
<u>B. Inmunizado</u>	CD-19	CD-3	CD-19	CD-3	CD-11c/B7-2	CD11c/B7-2
Inmunizado (30 días)	7,2%	87,3%	40%	39%	58,6%	60,3%
Después de la exposición al tumor (60 días)	10,9%	80,1%	25,4%	34%	53,5%	52,9%

Nota: en cada caso, los valores indican el porcentaje de células positivas del total de células cuantificadas.

25 El análisis de las poblaciones de células linfoides y de la maduración de las células dendríticas en los animales, 30 días después de la inmunización, indica que la vacunación con el ADN de VEGF no induce ningún cambio en el estado inmunológico del animal. No obstante, 30 días después de la implantación del tumor, los animales no vacunados muestran una disminución en la proporción de linfocitos T/linfocitos B (CD3/CD19) en nódulos linfáticos y en bazo, con respecto a la proporción antes de la exposición al tumor. Además, en particular en el bazo, existe una significativa reducción en el número de células linfoides. También se observó una reducción en el número de células dendríticas maduras en nódulos linfáticos y en bazo en estos animales. En el grupo de ratones vacunados con el ADN de VEGF se evidenció una recuperación significativa en todos los parámetros, que puede correlacionarse con la
30 reducción en los niveles de VEGF en el suero observada en los animales de este grupo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Center for Genetic Engineering and Biotechnology

<120> Inmunoterapias activas antiangiogénicas

5 <130> Listado de secuencias

<140> documento CU 2002/0076

<141> 15 de abril de 2002

10 <150> documento EP98001000

<151> 31 de enero de 1998

<160> 18

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

25 <400> 1

tgatccatg aactttctgc t 21

30 <210> 2

<211 > 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 2

40 gaattcaccg cctcggttg tc 22

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

50 <400> 3

tgatccatg aactttctgc t 21

<210> 4

55 <211 > 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 4

ctggcctgtg geaggtgcga tggcataat 30

5 <210> 5
 <211 > 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 5

15 attatggcaa tcgcacctgc acaaggccag 30

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 6

25 gaattcaccg cctcggcttg tc 22

<210> 7
 <211 > 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

35 <400> 7

tggatccatg aactttctgc t 21

40 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 8

50 gaattcaccg cctcggcttg tc 22

<210> 9
 <211>25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

60 <400> 9
 tggatccatg gagagcaagg tgctg 25

<210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 10
 10 gaattcacat cagcccactg gatgc 25
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 20
 <400> 11
 cctctagatg tgcaaaagtg g 21
 25 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 12
 35 tgagatcttc gggagcttc 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 45 <400> 13
 gaagatctgt ataaggactt c 21
 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 55 <400> 14
 tagcgccgc ttaaacagg 19
 60 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 5 <400> 15
 aggcctctac acctgccagg ca 22
 10 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 16
 20 cctaggtaa acaggaggag 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 30 <400> 17
 cccgggatat ttataaagat c 21
 <210> 18
 35 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 18
 tagcgccgc ttaaacagg 19
 45

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición inmunogénica que comprende un variante mutado del VEGF humano, en la que dichas mutaciones se realizan en el sitio de unión al receptor, y en la que dichos variantes mutados carecen de actividad biológica porque no pueden unirse a VEGFR2 pero reproducen las propiedades inmunogénicas del antígeno seleccionado, o sus oligonucleótidos codificantes, que comprende además opcionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptado.
- 10 2.- Una composición inmunogénica según la reivindicación 1, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en la partícula recombinante del antígeno nuclear de la hepatitis B, la partícula recombinante del antígeno nuclear de la hepatitis C, la proteína OPC, la proteína KLH, la proteína p64k de *Neisseria meningitidis*, o la VSSP derivada de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*.
- 15 3.- Una composición inmunogénica según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de trastornos que implican un aumento de la angiogénesis, seleccionados del grupo que consiste en tumores humanos, neoplasia maligna y sus metástasis, neoplasia benigna, procesos inflamatorios crónicos, procesos autoinmunológicos, y en alteraciones oculares.