

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 299**

51 Int. Cl.:
C07K 14/71 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08018875 .8**
- 96 Fecha de presentación: **12.09.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2014678**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2009**

54 Título: **PÉPTIDOS KDR Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN.**

30 Prioridad:
12.09.2002 JP 2002267285
07.03.2003 JP 2003062003
11.06.2003 JP 2003167042

73 Titular/es:
Oncotherapy Science, Inc.
2-1, Sakado 3-chome Takatsu-ku Kawasaki-shi
Kanagawa 213-0012, JP

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

72 Inventor/es:
Tahara, Hideaki;
Wada, Satoshi y
Tsunoda, Takuya

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 375 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos KDR y vacunas que los contienen

5 Campo técnico

La presente invención está relacionada con péptidos para utilizar en el tratamiento o prevención de tumores que son extremadamente útiles como vacunas para el cáncer, y fármacos que contienen estos péptidos, para el tratamiento y prevención de tumores.

10

Antecedentes

15 Los genes de antígenos de rechazo tumoral se han identificado principalmente para melanomas malignos, y de acuerdo con esto, se han desarrollado inmunoterapias contra el cáncer que utilizan estos genes. Específicamente, con reconocimiento de la importancia de los linfocitos T CD8-positivos en las respuestas inmunes antitumorales, ha llamado la atención la terapia con vacunas contra el cáncer que induce linfocitos T CD8-positivos específicos de tumor *in vivo*, y se está aplicando en varias aplicaciones clínicas. Además, también se ha descrito el mecanismo por el que los péptidos que constan de aproximadamente diez residuos de aminoácidos activan a los linfocitos T a través de la ruta de Clase I, mediante la asistencia de varias moléculas coestimuladoras para inducir linfocitos T citotóxicos específicos de tumor (LTC).. Además, se han identificado activamente los péptidos restringidos a moléculas de HLA individuales.

25 No obstante, el control completo de los tumores es actualmente imposible. Esto puede ser debido a la heterogeneidad de las células tumorales, a la reducción o desaparición de la expresión de MHC de Clase I en las células tumorales y a la ausencia de moléculas diana en las células tumorales. Además, los péptidos de antígeno tumoral identificados actualmente existen en algunos tipos de tumor, pero no en todos los tipos de tumor. Así, para resolver estos problemas, los presentes inventores no utilizan células tumorales como células diana, sino que se centran en las células endoteliales de los vasos tumorales. Más específicamente, las células endoteliales difícilmente presentan problemas relacionados con un descenso o desaparición de la expresión de MHC de Clase I, o heterogeneidad. Así, si se inducen los LTC dirigidos contra los vasos tumorales, pueden superarse los problemas de la terapia con vacunas convencionales contra el cáncer, como la desaparición de la Clase I y la ausencia de una molécula diana, independientemente del tipo de tumor, y pueden anticiparse excelentes efectos terapéuticos. Se han iniciado estudios en la angiogénesis tumoral a partir de hipótesis pioneras propuestas por Folkman et al. en los años 70 y han sido desarrolladas desde varias perspectivas. Se han llevado a cabo muchos estudios sobre los receptores (VEGFR) VEGF-VEGF para evaluar su significancia en la angiogénesis tumoral. Se han desarrollado exhaustivamente inhibidores de la angiogénesis como fármacos orientados a dianas, particularmente en la terapia contra el cáncer, y se han probado ya clínicamente. No obstante, las terapias que utilizan este concepto para los tratamientos de vacunas contra el cáncer no están todavía en uso. Una de las razones puede ser inmunotolerancia al VEGFR, que se expresa en células normales. No obstante, en la década de 1990, Plate, Millauer, y Risau et al confirmaron que el VEGFR se expresan fuertemente en las células endoteliales de los tejidos tumorales. Además, la respuesta inmune a los autoantígenos como CEA y HER/neu, que también se expresan en células normales, no es necesariamente de inmunotolerancia. Por lo tanto, los presentes inventores concluyeron que los VEGFR pueden utilizarse como dianas para la terapia con una vacuna para el cáncer.

45 Recientemente, se describió que la inmunización activa frente a los VEGFR puede inhibir la angiogénesis en tumores y la metástasis (The Journal of Experimental Medicine, 2002, 195: 12, 1575-1584). No obstante, esta bibliografía simplemente utilizó proteínas VEGFR solubles, y no realizó ninguna investigación sobre las secuencias de aminoácido de los péptidos efectivos.

50 Descripción de la Invención

Los presentes inventores se han centrado en las posibles terapias con vacunas para el cáncer que la diana VEGFR2 (KDR/flk-1; denominada de ahora en adelante KDR), en las que VEGFR2 se expresa fuertemente en células endoteliales de tejido tumoral, y se cree que está involucrado en la proliferación de células endoteliales a la señal de VEGF. Además, los presentes inventores realizaron un cribado en busca de los péptidos que puede utilizarse de forma efectiva como vacunas, examinando su especificidad y completando esta invención.

La presente invención proporciona lo siguiente (de [1] a [6]):

60 [1] Un nonapéptido o decapeptido seleccionado de péptidos que constan de la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 30, 29, 33, 34 40, 46 o 54 para utilizar en el tratamiento o prevención de tumores.

[3] Una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento y/o prevención de tumores, en el que la composición farmacéutica comprende uno o más péptidos definidos en la reivindicación 1 o 2.

65 [4] Una vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de tumores, en el que la vacuna comprende un péptido

definido en la reivindicación 1 o 2 como compuesto activo.

[5] La vacuna de la reivindicación 4 para utilizar en el tratamiento o prevención de tumores, que se utiliza para su administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02 o HLA-A24.

[6] La vacuna de la reivindicación 4 o 5 para utilizar en el tratamiento o prevención de tumores, que se utiliza para suprimir el crecimiento y/o metástasis de tumores malignos.

Breve descripción de las Figuras

La Fig. 1 muestra la citotoxicidad de los clones de LTC frente a las células diana.

La Fig. 2 muestra los resultados de los análisis de tetrámero de HLA en los clones de LTC establecidos: (a) clones de LTC inducidos por los péptidos de esta invención, y células de soporte; y (b) células de soporte (control).

La Fig. 3 muestra el efecto de la vacunación utilizando los péptidos de esta invención sobre la supervivencia de ratones BALB/c inoculados con Colon 26.

La Fig. 4 muestra el efecto de la vacunación utilizando los péptidos de esta invención sobre el crecimiento de tumores derivados de Colon 26.

La Fig. 5 muestra el efecto de la vacunación utilizando los péptidos de esta invención sobre la tasa de supervivencia de ratones inoculados con B16.

La Fig. 6 muestra el efecto de la vacunación utilizando los péptidos de esta invención sobre el crecimiento de tumores derivados de melanoma B16. Antes de la exposición mediante inyección subcutánea de células tumorales B16, los RTG A2/Kb se vacunaron dos veces, con un intervalo de una semana, con CD pulsadas con KDR773 (círculos negros), CD sólo (triángulos blancos), o HBSS (cuadrados blancos). La figura muestra el crecimiento tumoral medio ($P < 0,01$).

La Fig. 7 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C29-169 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción.

La Fig. 8 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C29-169 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción.

La Fig. 9 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C85-775 (KWC85-775) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos de esta descripción.

La Fig. 10 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C85-775 (KWC85-775) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos KDR.

La Fig. 11 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C51-1328 (KWC51) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos de esta descripción.

La Fig. 12 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C51-1328 (KWC51) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos KDR.

La Fig. 13 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos de esta descripción.

La Fig. 14 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos de esta descripción.

La Fig. 15 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L) en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos KDR.

La Fig. 16 muestra el efecto inhibitor de cada tipo de anticuerpo en el efecto citotóxico de LTC.

La Fig. 17 muestra la actividad inhibitoria de los péptidos de esta descripción en la respuesta angiogénica inducida por las células B16 en RTG A2/Kb. Los ratones se vacunaron dos veces con HBSS, CD no pulsadas o CD pulsadas con los péptidos epítipo de esta descripción (KDR190, KDR772, KDR773, KDR773-2L, KDR775 o KDR1084). Las flechas indican vasos sanguíneos formados de nuevo, que se extienden con un patrón característico en zig-zag.

La Fig. 18 muestra el efecto supresor de los péptidos de esta descripción en el aumento de volumen de los tumores humanos en ratones transgénicos.

- La Fig. 19 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KWC65-190 en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos de esta descripción, en presencia (cajas negras) o ausencia (cajas blancas) de los péptidos.
- 5 La Fig. 20 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KWC72-772 en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos de esta descripción, en presencia (cajas negras) o ausencia (cajas blancas) de los péptidos.
- La Fig. 21 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KWC72-772 en células positivas para HLA-A0201 que presentan péptidos KDR. HePG2-VEGFR2: cajas negras; HePG2-EGFP: cajas blancas.
- 10 La Fig. 22 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C7-1318 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción, en presencia (cajas negras) o ausencia (cajas blancas) de los péptidos.
- La Fig. 23 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KWC46 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción, en presencia (cajas negras) o ausencia (cajas blancas) de los péptidos.
- 15 La Fig. 24 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C18-189 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción, en presencia (cajas negras) o ausencia (cajas blancas) de los péptidos.
- 20 La Fig. 25 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C65-826 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción, en presencia (cajas negras) o ausencia (cajas blancas) de los péptidos.
- La Fig. 26 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C7-1318 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción. HT29-VEGFR2: cajas negras; HT29-EGFP: cajas blancas.
- 25 La Fig. 27 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC KWC46 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción. HT29-VEGFR2: cajas negras; HT29-EGFP: cajas blancas.
- La Fig. 28 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C18-189 en células positivas para HLA-A24 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción. HT29-VEGFR2: cajas negras; HT29-EGFP: cajas blancas.
- 30 La Fig. 29 muestra el efecto citotóxico del clon de LTC C65-826 en células positivas para HLA-A24 en células positivas para HLA-A24 que presentan péptidos de esta descripción. HT29-VEGFR2: cajas negras; HT29-EGFP: cajas blancas.
- 35 La Fig. 30 muestra la actividad inhibitoria de los péptidos de esta descripción sobre la respuesta angiogénica inducida por células Colon 26 en ratones BALB/c. Los ratones se vacunaron dos veces con HBSS, CD no pulsadas o CD pulsadas con un péptido epítipo de esta descripción (KDR189 o KDR826). Las flechas indican vasos sanguíneos formado de nuevo que presentan un patrón característico en zig-zag.
- 40 La Fig. 31 muestra la inhibición de la respuesta angiogénica inducida por células Colon 26 en BALB/c mediante péptidos de esta descripción. Las barras indican la media y las barras de error verticales indican el error estándar.
- La Fig. 32 muestra el efecto citotóxico de los LTC, derivados de pacientes estimulados con péptidos de esta descripción, sobre células positivas para HLA-A24, en presencia (rombos negros) o ausencia (cuadrados blancos) de los péptidos.
- 45 (A) el efecto citotóxico de LTC derivados de un paciente de cáncer de colon obtenido mediante estimulación con el Id. de Sec. N°: 8 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR169);
- 50 (B) el efecto citotóxico de LTC derivados de un paciente de cáncer de colon obtenidos mediante estimulación con el Id. de Sec. N°: 5 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR189); y
- 55 (C) el efecto citotóxico de LTC derivados de un paciente de cáncer de colon obtenidos mediante estimulación con el Id. de Sec. N°: 3 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR220).
- Modo de llevar a cabo la invención
- 60 Los presentes inventores consideraron en primer lugar que varias proteínas se presentan *in vivo* en las células presentadoras de antígeno tras ser degradadas a péptidos 9-meros (nonapéptidos), y se examinó la afinidad de unión de péptidos parciales 9-meros o 10-meros de las proteínas KDR a los antígenos HLA, que son los antígenos mayores de histocompatibilidad humanos (antígenos MHC). Las letras en minúscula en las secuencias de los péptidos que se muestran a la derecha en la Tabla 1 indican el quinto aminoácido.
- 65 La secuencia de aminoácidos de la proteína KDR humana es bien conocida, se describe en la patente estadounidense N° 5.861.301 por ejemplo, y un experto en la materia puede obtenerla fácilmente. Los péptidos 9-

meros y 10-meros pueden obtenerse sintetizando péptidos iniciados a partir de cualquier posición, en base a la secuencia completa de aminoácidos de la proteína KDR obtenida. Los péptidos pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos convencionales utilizados en la química de péptidos. Los métodos de síntesis comúnmente utilizados se describen, por ejemplo, en bibliografía como Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide Synthesis (Peputido Gousei), Maruzen Co., Ltd., 1975; Foundations and Experiments in Peptide Synthesis (Peputido Gousei no Kiso to Jikken), Maruzen Co., Ltd., 1985; y Development of Pharmaceuticals, New Series (Iyaku hin no Kaihatsu, Zoku), Volumen 14, Peptide Synthesis (Peputido Gousei), Hirokawa Shoten, 1991, y en publicaciones como la Publicación Internacional N° WO 99/67288. La unión a los antígenos HLA puede analizarse mediante el aislamiento de células que comprenden antígenos HLA en su superficie celular, como las células dendríticas, y utilizando métodos convencionales para medir la unión de los péptidos a las células.

Alternativamente, pueden utilizarse los programas disponibles actualmente en Internet, como los descritos en Parker K. C., J. Immunol. 152, 1994, para calcular las afinidades de unión entre varios péptidos y los antígenos HLA *in silico*. La afinidad de unión a los antígenos HLA puede determinarse como se describe, por ejemplo, en Parker, K. C., J. Immunol., 152, 1994; y Nukaya, I., Int. J. Cancer, 80, 1999.

Para obtener suficientes resultados, preferiblemente se utilizan como antígenos HLA los antígenos tipo A-24 y tipo A-02, que se cree que son de elevada expresión entre los japoneses. Más preferiblemente, se utilizan los subtipos A-2402 y A-0201. No obstante, a nivel clínico, puede seleccionarse de forma apropiada un péptido con un mayor nivel de afinidad de unión a antígeno o mayor nivel de inducibilidad de células T citotóxicas (LTC) tras la presentación del antígeno, al predeterminar el tipo de antígeno HLA de un paciente en necesidad de un tratamiento. Además, para obtener péptidos con niveles elevados de afinidad de unión y de inducibilidad de LTC, puede realizarse una sustitución o adición de uno, dos o varios aminoácidos en base a la secuencia de aminoácidos del péptido parcial de KDR que aparece en la naturaleza. Aquí, el término "varios" significa cinco o menos, o preferiblemente tres o menos. Además de los péptidos en la naturaleza, también se conoce la regularidad de la secuencia de los péptidos presentados mediante la unión a antígenos HLA (J. Immunol., 152, 3913, 1994; Immunogenetics. 41: 178, 1995; J. Immunol. 155: 4307, 1994). Así, las modificaciones basadas en esta regularidad también pueden realizarse en los péptidos obtenidos. Por ejemplo, los péptidos en los que el segundo aminoácido del extremo N-terminal se sustituye por fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y en el que el aminoácido en C-terminal se sustituye por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina también pueden utilizarse preferiblemente como péptidos con elevada afinidad de unión a HLA-24. Por otro lado, los péptidos en los que el segundo aminoácido del extremo N-terminal se sustituye por leucina o metionina, y en el que el aminoácido en C-terminal se sustituye por valina o leucina pueden utilizarse preferiblemente como péptidos con elevada afinidad de unión a HLA-0201. Además, también pueden añadirse de uno a dos aminoácidos al extremo N y/o C-terminal de los péptidos.

No obstante, cuando la secuencia de un péptido es idéntica a la porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena con una función diferente, esto puede causar efectos colaterales como enfermedades autoinmunes o síntomas alérgicos frente a sustancias específicas. Por lo tanto, es preferible utilizar las bases de datos disponibles para realizar búsquedas de homología, y evitar situaciones en las que una secuencia se corresponde con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Además, si las búsquedas de homología revelan que no existen péptidos, incluso que comprendan una diferencia de uno o dos aminoácidos, no existe riesgo de tales problemas causados por las modificaciones de las anteriormente mencionadas secuencias de aminoácido para aumentar la afinidad de unión a los antígenos HLA y/o la inducibilidad de LTC.

Como se ha descrito anteriormente, se espera que los péptidos con elevada afinidad de unión a los antígenos HLA tengan una gran efectividad como vacunas del cáncer. No obstante, es necesario determinar si los péptidos candidatos, que se seleccionan utilizando como indicador la elevada afinidad de unión, realmente presentan inducibilidad de LTC o no. La confirmación de la inducibilidad de LTC se realiza induciendo las células presentadoras de antígeno que comprenden antígenos MHC humanos (como los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas), más específicamente células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana; estimulando las células con los péptidos; mezclando las células con células positivas para CD8; y luego midiendo la citotoxicidad frente a las células diana. Como sistema de reacción, pueden utilizarse animales transgénicos generados para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en Hum. Immunol. 2000 Aug.; 61 (8): 764-79 Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response., BenMohamed L., Krishnan R., Longmate J., Auge C., Low L., Primus J., y Diamond DJ.). Por ejemplo, mediante radiomarcado de las células diana con ⁵¹Cr o similar, puede calcularse la citotoxicidad a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, la actividad puede analizarse midiendo el IFN-γ producido y liberado por los LTC en presencia de las células presentadoras de antígeno que tienen péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en el medio utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ.

Los resultados del análisis de la inducibilidad de LTC de los péptidos descritos anteriormente revelaron que los de elevada afinidad de unión a los antígenos HLA no necesariamente muestran una elevada inducibilidad. Además, los nonapéptidos seleccionados a partir de los péptidos que comprenden las secuencias de aminoácido VYSSEEAEEL

(Id. de Sec. N°: 2), GYRIYDVVL (Id. de Sec. N°: 3), SYMISYAGM (Id. de Sec. N°: 5), RFVDPGNRI (Id. de Sec. N°: 8), KWEFPRDRL (Id. de Sec. N°: 11) o DFLTLEHLI (Id. de Sec. N°: 12), y los nonapéptidos y decapéptidos seleccionados a partir de los péptidos que comprenden las secuencias de aminoácido AMFFWLLL (Id. de Sec. N°: 29), VIAMFFWLL (Id. de Sec. N°: 30), AVIAMFFWL (Id. de Sec. N°: 33), KLIEIGVQT (Id. de Sec. N°: 34), YMISYAGMV (Id. de Sec. N°: 40) o IQSDVWSFGV (Id. de Sec. N°: 46), mostraron una inducibilidad de LTC particularmente elevada.

La presente invención describe además péptidos con inducibilidad de células T citotóxicas, en los que uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen o se añaden a la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 2, 3, 5, 8, 11 o 12. Las secuencias de aminoácidos, que constan de nueve aminoácidos de Id. de Sec. N°: 2, 3, 5, 8, 11 y 12, en las que uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen o se añaden pueden presentar inducibilidad de LTC siempre que no se correspondan con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. En particular, por ejemplo, el segundo aminoácido del extremo N-terminal preferiblemente se sustituye por fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, o el aminoácido en C-terminal preferiblemente se sustituye por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina; o se añaden uno o dos aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal.

La presente invención también describe péptidos con inducibilidad de células T citotóxicas, en los que uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen o se añaden a la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 29, 30, 33, 34, 40 o 46. Las secuencias de aminoácidos, que constan de nueve o diez aminoácidos de Id. de Sec. N°: 29, 30, 33, 34, 40 o 46, en las que uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen o se añaden pueden presentar inducibilidad de LTC siempre que las secuencias no se correspondan con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. En particular, por ejemplo, el segundo aminoácido del extremo N-terminal preferiblemente se sustituye por leucina o metionina, o el aminoácido en C-terminal preferiblemente se sustituye por valina o leucina; o se añaden uno o dos aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal. Un ejemplo de tal péptido modificado es el péptido de Id. de Sec. N°: 30, en el que el segundo aminoácido del extremo N-terminal se sustituye por leucina (Id. de Sec. N°: 54), pero este ejemplo no es limitante. Los clones de LTC obtenidos en la estimulación con estos péptidos modificados pueden reconocer los péptidos originales y causar daños.

Los péptidos de esta descripción pueden utilizarse solos o en combinaciones de dos o más, como vacunas contra el cáncer capaces de inducir los LTC *in vivo*. Mediante la administración de los péptidos de esta invención, los péptidos se presentan con una elevada densidad a los antígenos HLA de las células presentadoras de antígeno. Los LTC que reaccionan específicamente con los complejos formados entre los péptidos presentados y los antígenos HLA se inducen, aumentando la agresión frente a las células endoteliales vasculares en las células tumorales diana. Alternativamente, las células presentadoras de antígeno en cuya superficie celular se inmovilizan péptidos de esta invención pueden obtenerse mediante la derivación de células dendríticas de un sujeto, y su estimulación con los péptidos de esta invención. Las células presentadoras de antígeno obtenidas se readministran a los sujetos para inducir los LTC en los sujetos. Como resultado, puede aumentarse la agresión hacia las células diana.

Más específicamente, la presente invención proporciona productos farmacéuticos para su uso en el tratamiento de tumores o prevención de la proliferación, metástasis y similares de los tumores, en los que los productos farmacéuticos comprenden uno o más péptidos de esta descripción. La angiogénesis en los lugares patológicos está fuertemente asociada no sólo con los tumores, sino también con enfermedades como la retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis y aterosclerosis, y con la metástasis de los tumores sólidos (Folkman, J., *Nature Med.* 1: 27-31 (1995); Bicknell, R., Harris, A.L., *Curr. Opin. Oncol.* 8: 60-65 (1996)). Por lo tanto, los péptidos de esta descripción pueden utilizarse para tratar tumores, enfermedades como la retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis, aterosclerosis y metástasis de los tumores sólidos.

Se confirmó que los péptidos de esta descripción inhibían la formación de vasos sanguíneos tortuosos, que son morfológicamente diferentes de los vasos sanguíneos normales, y que se forman en los tejidos tumorales malignos. Los resultados de analizar la cicatrización y la fertilidad en ratones vacunados también confirmaron que los péptidos no provocan efectos adversos sobre la angiogénesis fisiológica normal. Además, se analizó *in vitro* la citotoxicidad frente a las células endoteliales no proliferativas o proliferativas utilizando los clones de LTC que reconocen los péptidos de esa invención. Estos clones mostraron una mayor actividad frente a las células endoteliales proliferativas que frente a las células endoteliales no proliferativas. Más específicamente, estos pueden funcionar muy específicamente en los trastornos que involucran células endoteliales proliferativas, y particularmente el cáncer.

La estimulación *in vivo* e *in vitro* de células dendríticas mediante los péptidos de esta descripción puede realizarse fácilmente mediante la exposición de células a una elevada concentración de péptidos, lo que causa que estos péptidos reemplacen a los péptidos originalmente inmovilizados sobre las células. Por lo tanto, los péptidos utilizados en esta invención deben tener al menos cierto nivel de afinidad de unión a los antígenos HLA.

Los productos farmacéuticos de esta invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de tumores pueden administrarse directamente como los péptidos de esta invención en sí mismos, o pueden administrarse como composiciones farmacéuticas que se han formulado mediante los métodos de formulación convencionales. En tales casos, los productos farmacéuticos de esta invención pueden incluir de forma apropiada, además de los péptidos de esta invención, transportadores, excipientes y similares que normalmente se usan en los productos farmacéuticos,

sin limitaciones particulares. Los productos farmacéuticos de esta invención se utilizan para el tratamiento y prevención de varios tumores, como el cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata y tumores cerebrales. Los péptidos de esta invención no atacan las células tumorales en sí mismas, sino que atacan las células endoteliales de los vasos sanguíneos que se forman de nuevo en los tejidos tumorales. Por lo tanto, una gran variedad de tumores pueden ser objeto de tratamiento, y los productos farmacéuticos de esta invención no tienen limitaciones particulares en su utilización.

Los productos farmacéuticos para tratar y/o prevenir tumores, que comprenden un péptido de esta invención como compuesto activo, pueden administrarse con adyuvantes de forma que la inmunidad celular se induzca de forma efectiva; pueden administrarse con otros compuestos activos como los agentes antitumorales; y pueden administrarse en formas granulares. Son aplicables estos adyuvantes descritos en la bibliografía (Clin. Microbiol. Rev., 7: 277-289, 1994) o similares. Además, los productos farmacéuticos de esta invención pueden administrarse como formulaciones de liposomas, como formulaciones granulares unidas a cuentas de pocos micrómetros de diámetro, y como formulaciones a las que se unen lípidos. Los métodos de administración pueden realizarse, por ejemplo, por vía oral, por vía intradérmica o por vía subcutánea, o a través de inyección intravenosa, o similar. Puede utilizarse una administración sistémica o una administración local en los alrededores del tumor diana. Las dosis de los péptidos de esta invención pueden ajustarse de forma apropiada, dependiendo de la enfermedad a tratar, edad y peso de los pacientes, métodos de administración y similares. Normalmente se administran preferiblemente de 0,001 mg a 1000 mg, preferiblemente de 0,01 mg a 100 mg, más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg, de los péptidos de esta invención una vez durante algunos días y hasta varios meses. El experto en la materia podrá seleccionar de forma adecuada las dosis apropiadas.

Alternativamente, la presente descripción proporciona vesículas intracelulares que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y los antígenos HLA en su superficie. Estas vesículas intracelulares se denominan exosomas. Los exosomas pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con los métodos específicamente descritos en la traducción japonesa publicada de las publicaciones internacionales N° Hei 11-510507 y 2000-512161. Los exosomas pueden obtenerse preferiblemente utilizando células presentadoras de antígeno obtenidas de sujetos que van a someterse a terapia o profilaxis. Los exosomas de esta descripción pueden inocularse como vacunas del cáncer, como los péptidos de esta invención.

El tipo de antígenos HLA a utilizar debe corresponderse con el del sujeto en necesidad de terapia y/o profilaxis. Por ejemplo, para los japoneses, el HLA-A24 o HLA-A02, en particular HLA-A2402 o HLA-0201, a menudo es apropiado.

La presente invención también describe los métodos para inducir las células presentadoras de antígeno utilizando los péptidos de esta invención. Las células presentadoras de antígeno pueden inducirse mediante la inducción de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica; y luego poniéndolas en contacto (estimulándolas) con los péptidos de esta invención, *in vitro* o *in vivo*. La administración de los péptidos de esta descripción a los sujetos induce en el cuerpo del sujeto las células presentadoras de antígeno en las que los péptidos de esta descripción se inmovilizan. Alternativamente, los péptidos de esta invención pueden inmovilizarse en las células presentadoras de antígeno a administrar al sujeto como vacuna.

La presente descripción también proporciona métodos para inducir células presentadoras de antígeno con un elevado nivel de inducibilidad de células T citotóxicas, en el que dichos métodos comprenden la introducción *in vitro* en una células presentadoras de antígeno de un gen que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de esta descripción. Los genes a introducir pueden estar en forma de DNA o RNA. Los métodos de introducción pueden ser diferentes métodos comúnmente utilizados en la materia, como los métodos de lipofección, electroporación y fosfato cálcico, sin limitaciones particulares. Más específicamente, los métodos pueden realizarse como se describen en, por ejemplo, Cancer Res., 56: 5672, 1996; J. Immunol., 161: 5607, 1998; J. Exp. Med., 184: 465, 1996; o la traducción japonesa publicada de las publicaciones internacionales N° 2000-509281. Mediante la introducción de genes en las células presentadoras de antígeno, los genes se someten a transcripción, traducción y similares en las células. Las proteínas obtenidas se someten entonces a un procesamiento de MHC de clase I o II y a la vía de presentación para presentar los péptidos parciales.

Además, la presente descripción proporciona los métodos para inducir los LTC utilizando los péptidos de esta descripción. Mediante la administración de los péptidos de esta descripción a un sujeto, se inducen los LTC en el cuerpo del sujeto, potenciando la inmunidad frente a las células endoteliales angiogénicas en los tejidos tumorales. Alternativamente, los métodos pueden utilizarse en métodos terapéuticos *ex vivo*, en los que las células presentadoras de antígeno derivadas del sujeto, células positivas para CD8, o leucocitos mononucleares de sangre periférica se ponen en contacto (se estimulan) *in vitro* con los péptidos de esta descripción para inducir LTC, y luego las células se devuelven al sujeto.

Además, la presente descripción proporciona células T citotóxicas, que se inducen utilizando los péptidos de esta descripción y luego se aíslan. Las células T citotóxicas, que se han inducido mediante estimulación con las células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos de esta invención, se derivan preferiblemente de los sujetos que se van a someter a terapia y/o profilaxis. Los linfocitos T citotóxicos pueden administrarse solos o, con propósito de obtener un efecto antitumoral, en combinación con otros fármacos, los que incluye los péptidos, exosomas y

demás de esta descripción. Los linfocitos T citotóxicos obtenidos actúan específicamente frente a las células diana que presentan los péptidos de esta descripción, o preferiblemente, frente a las células diana que presentan los mismos péptidos utilizados para la inducción. Las células diana pueden ser células que expresan de forma endógena el KDR, o células en las que se ha forzado la expresión de KDR. Además, también pueden convertirse en diana las células que presentan los péptidos de esta descripción sobre su superficie celular debido a la estimulación mediante estos péptidos.

La presente descripción también proporciona unas células presentadoras de antígeno que presentan complejos formados entre los antígenos HLA y los péptidos de esta descripción. Las células presentadoras de antígeno que se obtienen mediante el contacto con los péptidos de esta descripción, o con nucleótidos que codifican los péptidos de esta descripción, derivan preferiblemente de sujetos a los que se desea someter a terapia y/o profilaxis. Las células presentadoras de antígeno pueden administrarse como vacunas en sí mismas, o en combinación con otros fármacos como los péptidos de esta descripción, exosomas y células T citotóxicas.

Mejor forma de llevar a cabo la invención

A continuación, se describe la presente invención de forma específica utilizando Ejemplos, pero no debe tomarse como una limitación de la misma.

[Ejemplo 1] Predicción de péptidos derivados de VEGFR-2 (KDR)-- 1 (HLA-A*2402)

Basados en la secuencia completa de aminoácidos de la proteína KDR, se predijeron doce tipos de péptidos 9-meros (Id. de Sec. N°: 1 a 12), y doce tipos de péptidos 10-meros (Id. de Sec. N°: 13 a 24) ordenados desde la afinidad de unión más alta a HLA-A*2402, utilizando el programa de Predicción de Unión de Péptidos a HLA de la Sección de Análisis Molecular y Bioinformática (BIMAS) (http://bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (Tabla 1). La Tabla 1 muestra la afinidad de unión de cada uno de los 9-meros y 10-meros ordenados desde el valor de afinidad más alto, junto con la posición de su N terminal en la secuencia de aminoácidos de la proteína KDR. En la tabla, CE652 (Id. de Sec. N°: 25) se refiere a uno de los epítomos del antígeno tumoral CEA (antígeno carcinoembrionario) descrito por Nukaya, I. (Int. J. Cancer 80, 1999). Los péptidos de VIH (ILKEPVHGV (Id. de Sec. N°: 55) y RYLRDQQL (Id. de Sec. N°: 56)) se utilizaron como péptidos de control negativo.

Los péptidos se sintetizaron de acuerdo con los métodos de síntesis estándar en fase sólida utilizando Cleaved PepSet (Mimotope, San Diego, CA), y se purificaron mediante HPLC de fase reversa. La pureza (>95%) y el tipo de péptido se determinaron individualmente utilizando HPLC y espectrometría de masas.

Tabla 1 Unión de HLA-A*2402 a los péptidos derivados de KDR

Id. de Sec. N°	POSICIÓN INICIO	SECUENCIA AA (9meros)	AFINIDAD DE UNIÓN*1	Id. de Sec. N°	POSICIÓN INICIO	SECUENCIA AA (10meros)	AFINIDAD DE UNIÓN*1
1	KDR583	WYKLCQPL*3	240	13	KDR950	DYVVGaIPVDL*3	420
2	KDR1318	VYSSEEAEEL	220	14	KDR434	SYQYgTTQTL*3	360
3	KDR220	GYRIYDVVL	200	15	KDR1058	DYVRkGDARL*3	300
4	KDR920	KFGNLSTYL*3	48	16	KDR304	LYTCaASSGL*3	200
5	KDR189	SYMISYAGM	38	17	KDR1318	VYSSeEAELL*3	200
6	KDR828	EFPRDRLKL*3	33	18	KDR734	LYTCqACSVL*3	200
7	KDR1152	TFSELVEHL*3	29	19	KDR926	TYLRsKRNEF*3	198
8	KDR169	RFVPDGNRI*3	22	20	KDR353	KYLCyPPPEI*3	16
9	KDR331	AFGSGMESL*3	20	21	KDR116	VYVQdYRSPF*3	150
10	KDR604	KNLDTLWKL*3	16	22	KDR395	NYTVILTNPi*3	72
11	KDR826	KWEFPRDRL	12	23	KDR777	FFWLILVIL*3	24
12	KDR998	DFLTLEHLI	9	24	KDR193	SYAGmVFCEA*3	9,2
25	CE652*2	TYACFVSNL*3	200				

*1 Parker KC: 1994. J. Immunol 152

*2 Nukava I: 1999 Int. J. Cancer 80

5 *3 los péptidos se listan sólo a modo informativo.

10 [Ejemplo 2] Establecimiento de líneas LTC utilizando los péptidos predichos

Las líneas celulares de linfocitos B inmortalizados de virus Epstein-Barr (EBV), TISI (HLA-A24/24) y EHM (HLA-A3/3), fueron proporcionados por Takara Shuzo Biotechnology Research Laboratory.

15 El serotipaje de HLA se realizó utilizando 7 mL de sangre periférica recogida de un sujeto sano. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica HLA-A24-positiva utilizando centrifugación por gravedad específica con Ficoll Paque (Pharmacia).

20 Los PBMC obtenidos se dejaron reposar diez horas en un frasco de cultivo (Corning, 43072). Tras eliminar las células en suspensión, se cultivaron en medio AIM-V las células adheridas al frasco (Invitrogen) suplementado con autosuero al 2% añadiendo 1000 U/mL de GM-CSF humana (proporcionado por Kirin Brewery), y 1000 U/mL de IL-4 humana (Genzyme). Cinco días después, las células se cultivaron durante otras 48 horas en 10 µg/mL de OK-432 (proporcionado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), y se utilizaron como células presentadoras de antígeno para la inducción de LTC. Las células dendríticas (CD) se confirmaron que eran CD mediante reacción con anticuerpos marcados con FITC anti-Clase II, CD80, y CD86, y con anticuerpos marcados con PE anti-Clase I, CD11c, CD40 (todos de Beckton-Dickinson), y anticuerpos CD83 (Immunotech); seguido de análisis de los antígenos de superficie mediante FACS-Calibur (Beckton- Dickinson) utilizando el programa Cell Quest.

30 Las CD preinducidas se sometieron a un pulso durante cuatro horas a 20°C con doce clases de péptidos 9-meros (Id. de Sec. N°: 1 a 12) (20 µg/mL), que se predijeron en el Ejemplo 1 que tenían alta afinidad de unión, en presencia de 3 µg/mL de µ2-microglobulina. Las CD resultantes se mezclaron con células CD8-positivas seleccionadas con cuentas magnéticas (Dynabeads M-450 y Detachabeads) de los PBMC, en una proporción de 1:20 o 1:2, y después se cultivaron en una placa de 48 pocillos (Corning), en presencia de 10 ng/mL de IL-7 humana (Genzyme). Tres días después, se añadió IL-2 (Sigma) a una concentración final de 10 U/mL al cultivo. Siete y 14 días después, las mismas CD se estimularon para inducir LTC, y 20 días después, se midió la citotoxicidad de cada pocillo utilizando células TISI pulsadas con péptido como dianas. Sólo los pocillos positivos se cultivaron mediante un método de estimulación con líneas celulares de alo-PBMC, linfocitos B EBV-inmortalizadas (EHM), y 30 ng/mL de anticuerpo anti-CD3. Se analizaron funcionalmente los LTC 14 días después.

40 Se evaluó la actividad citotóxica en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de cuatro horas. Las células diana se sometieron a un pulso con péptidos a una concentración de 20 µg/mL durante la noche. Las células diana se marcaron con 100 PCi de Na₂⁵¹CrO₄ a 37°C durante una hora, y se lavaron tres veces con RPMI1640. Se colocaron las células diana (1x 10⁴ células/ 100 µL) y 100 µL de células efectoras a varias concentraciones con un volumen total de 200 µL en una placa microtitulada de 96 pocillos en forma de U (Corning), y se cultivaron en un incubador de CO₂ a 37°C durante cuatro horas. Tras el cultivo, se recogió 100 µL de sobrenadante de cada pocillo y se midió utilizando un contador □. La desintegración natural de la radioactividad fue en las células diana y el medio, y la máxima desintegración de la radioactividad fue en las células diana y HCl 1M. La actividad citotóxica (porcentaje de lisis específica) se calculó mediante la siguiente fórmula:

50
$$\text{Actividad citotóxica (\% de citotoxicidad)} = \frac{(\text{desintegración experimental} - \text{desintegración natural})}{(\text{máxima desintegración} - \text{desintegración natural})} \times 100$$

55 Como resultado, se establecieron seis tipos de líneas de LTC, como se muestra en la Tabla 2. En particular, los nonapéptidos mostrados por Id. de Sec. N°: 2 (posición del aminoácido de iniciación en KDR1318), Id. de Sec. N°: 3 (KDR220), Id. de Sec. N°: 5 (KDR189), Id. de Sec. N°: 8 (KDR169), Id. de Sec. N°: 11 (KDR826), e Id. de Sec. N°: 12 (KDR998) se determinaron que eran efectivos como péptidos epítopo.

Tabla 2

5	Id. de Sec. N°:	POSICIÓN INICIO	SECUENCIA AA	AFINIDAD DE UNIÓN ^{*1}	ACTIVIDAD CITOTÓXICA			
					X20		X2	
					pep(+)	pep(-)	pep(+)	pep(-)
10	1	KDR583	WYKLG PQPL*3	240	6%	4%	0%	0%
	2	KDR1318	VYSSEEAEEL	220	39%	21%	8%	3%
	3	KDR220	GYRIYDVVL	200	57%	2%	20%	0%
	4	KDR920	KFGNLSTYL*3	48	3%	4%	0%	2%
	5	KDR189	SYMISYAGM	38	41%	3%	20%	0%
	6	KDR828	EFPRDLKL*3	33	3%	2%	1%	0%
	7	KDR1152*3	TFSELVEHL	29	0%	0%	0%	0%
15	8	KDR169	RFVPDGNRI*3	22	98%	2%	53%	0%
	9	KDR331	AFGSGMESL*3	20	6%	6%	0%	0%
	10	KDR604	KNLDTLWKL*3	16	3%	2%	1%	1%
	11	KDR826	KWEFPRDL	12	23%	0%	11%	0%
	12	KDR998	DFLTLEHLI	9	13%	4%	8%	0%
20	25	CE652 ^{*2}	TYACFVSNL*3	200	29%	16%	7%	1%

*1 Parker KCC: 1994.J.Immunol 152

25 *2 Nukaya I: 1999 Int.J.Cancer 80

*3 los péptidos se listan sólo a modo informativo

30 [Ejemplo 3] Establecimiento de clones de LTC derivados de los péptidos predichos

35 Los seis tipos de líneas de LTC establecidas en el Ejemplo 2 se diluyeron a 0,3, 1, o 3 células/ pocillo en una placa de 96 pocillos en forma de U. Se añadieron a cada pocillo 7x 10⁴ células/ pocillo de alo-PBMC, 1x 10⁴ células/ pocillo de EHM, 30 ng/mL de anticuerpo anti-CD3, y 125 U/mL de IL-2, y se le añadió AIM-V suplementado con autoserum al 5%, por lo que la concentración total fue de 150 µL/ pocillo. Diez días después, se añadieron 50 µL/ pocillo de medio suplementado con IL-2 ajustado a una concentración final de IL-2 de 125 U/mL. Se analizaron funcionalmente los LTC el día 14, y los LTC con actividad se cultivaron a gran escala.

40 Como resultado, de cada uno de los cinco tipos de nonapéptidos mostrados por Id. de Sec. N°: 8 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR169), Id. de Sec. N°: 5 (KDR189), Id. de Sec. N°: 3 (KDR220), Id. de Sec. N°: 2 (KDR1318), e Id. de Sec. N°: 11 (KDR826), ocho tipos (C13-169, C19-169, C29-169, C53-169, C72-169, C61-169, K5-169, y K25-169), dos tipos (C12-189 y C18-189), once tipos (KWC3, 23, 25, 26, 36, 42, 46, 58, 61, 70, y 77), un tipo (C7-1318), y un tipo (C65-826) de clon de LTC se establecieron, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3

50	NOMBRE DEL CLON	ACTIVIDAD CITOTÓXICA				
		X 20		X 2		
		Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)	
55	C13-169	98%	2%	66%	2%	
	C19-169	94%	2%	50%	0%	
	C29-169	100%	1%	70%	0%	
	C53-169	100%	2%	91%	2%	
	C72-169	87%	1%	39%	0%	
	C61-169	88%	0%	38%	0%	
	K5-169	36%	0%	6%	0%	
	K25-169	27%	0%	5%	0%	
	60	C12-189	27%	18%	7%	3%
		C18-189	67%	18%	28%	7%
KWC3		54%	2%	11%	1%	
65	KWC23	95%	1%	49%	1%	
	KWC25	93%	1%	70%	1%	
	KWC26	87%	1%	34%	0%	
	KWC36	62%	2%	11%	2%	

	KWC42			67%	0%
	KWC46	94%	1%	51%	0%
	KWC58			76%	0%
5	KWC61	70%	2%	19%	1%
	KWC70	92%	3%	64%	2%
	KWC77	99%	3%	70%	2%
	C65-826	38%	6%	8%	3%
	C7-1318	84%	1%	62%	1%

10 [Ejemplo 4] Medición de la citotoxicidad de los clones de LTC establecidos

Se analizó el grado de citotoxicidad de los diez tipos de clones de LTC establecidos en el Ejemplo 3 variando la proporción con las células diana (proporción E:T).

15 Como resultado, C53-169 derivado del nonapéptido de Id. de Sec. N°: 8 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR169) mostró la mayor citotoxicidad.

[Ejemplo 5] Análisis de tetrámeros de HLA de los clones de LTC establecidos

20 Se sintetizó un tetrámero de HLA a partir de HLA-A*2402 y el péptido de Id. de Sec. N°: 8 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR169). Más específicamente, los vectores plasmídicos que expresan la cadena H (aproximadamente 35 kDa) y la cadena L (aproximadamente 11 kDa) se produjeron individualmente, y su proteína recombinante se expresó utilizando *E. coli*. El vector plasmídico de la cadena H contiene sólo el dominio extracelular, en el que el carboxilo terminal se sustituyó con una secuencia de reconocimiento de enzima de biotinylicación. La

25 cadena H y la cadena L forman un complejo de péptidos de HLA mediante el repliegamiento con un péptido antigénico. Los complejos de péptidos de HLA se biotinilaron mediante un enzima de biotinylicación, el exceso de biotina se eliminó mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio de iones, y los complejos de péptidos de HLA biotinilados se aislaron y purificaron. El tetrámero de HLA se sintetizó haciendo reaccionar el complejo de péptidos de HLA biotinilado obtenido con estreptavidina (SA) en una proporción molar de

30 4:1 para formar un tetrámero. Cuando se analizaron las muestras, se utilizó SA marcada fluorescentemente con ficoeritrina (PE) (SA-PE) para formar el tetrámero. La molécula de CD8 se conoce porque se une al 245° aminoácido en el dominio $\alpha 3$, que es una alanina, con la excepción de las porciones de HLA-A, B, y C. Por lo tanto, los presentes inventores mutaron la alanina en los tetrámeros de HLA en una valina, para producir un tetrámero de HLA mutante capaz de detectar de forma selectiva los LTC con alta avidez hacia los complejos de péptidos de HLA,

35 independientemente de la unión entre la molécula de CD8 y el dominio $\alpha 3$.

Los clones LCT establecidos se detectaron mediante el mutante sintetizado tetrámero KDR169 HLA-A24. Como resultado, como se muestra en la Fig. 2, se vio que los clones LCT establecidos se tiñeron fuertemente mediante las fracciones tetrámero-positivo y CD8-positivo, y que reconocen específicamente los complejos formados entre los péptidos de esta invención y los antígenos HLA. Las señales en las fracciones tetrámero-negativo y CD8-negativo se debe a las células de soporte.

40

[Ejemplo 6] Predicción de péptidos derivados de VEGFR-2 (KDR) --2(HLA- A*0201)

45 De forma similar al Ejemplo 1, se predijeron 15 tipos de péptidos 9-meros (Id. de Sec. N°: 26 a 40), y 12 tipos de péptidos 10-meros (Id. de Sec. N°: 41 a 52) de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína KDR, ordenados desde la afinidad de unión más alta con HLA-A*0201, utilizando el programa de Predicción de Unión de Péptidos a HLA (http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (Tabla 4). La tabla 4 muestra la afinidad de unión de cada uno de los 9 meros y 10 meros ordenados desde el valor de afinidad más alto, junto con la posición de su N terminal en la secuencia de aminoácidos de la proteína KDR. En la tabla, CEA588 (Id. de Sec. N°: 53) se refiere a uno de los epítopos del antígeno tumoral CEA (antígeno carcinoembrionario) descrito por Tanaka, H. et al. (presentación de póster, AACR N°3669, vol. 42, p681-682, Marzo 2001).

50

Tabla 4 Unión de HLA- A*0201 a los péptidos derivados de KDR*

Id. de Sec. N°:	INICIO POSICIÓN	SECUENCIA AA	AFINIDAD	Id. de Sec. N°:	INICIO POSICIÓN	SECUENCIA AA	AFINIDAD	DE UNIÓN	
								(9meros)	(10meros)
26	KDR	1093	VLLWEIFSL*2	1792	41	KDR	1094	LLWEIFSLGA*2	1092
27	KDR	633	SLQDQGDYV*2	769	42	KDR	5	VLLAVLWLC*2	539
28	KDR	5	VLLAVLWLC*2	739	43	KDR	313	LMTKkNSTFV*2	470
29	KDR	775	AMFFWLLLV 427	44	KDR	779	WLLLVIILRT*2		292
30	KDR	773	VIAMFFWLL 270	45	KDR	505	ALIEgKNKTV*2		285
31	KDR	1034	ILLSEKNVV*2	179	46	KDR10	84	IQSDvWSFGV	285
32	KDR	604	KNLDTLWKL*2	128	47	KDR	733	GLYTcQACSV*2	223
33	KDR	772	AVIAMFFWL 113	48	KDR	780	LLLVIILRTV*2		201
34	KDR	1328	KLIEIGVQT 107	49	KDR	6	LLAVLWLCV*2		201
35	KDR	698	IMWFKDNET*2	76	50	KDR	137	YITEnKNKTV*2	180
36	KDR	608	TLWKLNATM*2	41	51	KDR10	35	LLSEKNVVKI*2	167
37	KDR	491	FQGGNKIEV*2	32	52	KDR	4	KVLLaVALWL*2	133
38	KDR	435	YQYGTTQTL*2	32					
39	KDR	505	ALIEGKNKT*2	31					
40	KDR	190	YMISYAGMV	30	53	CEA	588*1	DVLYGPDTP *2	0,25

*1 Tanaka H et al.: Póster presentado en AACR 2001

*2 los péptidos se listan sólo a modo informativo.

[Ejemplo 7] Determinación de péptidos epítipo inmovilizados de HLA-A*0201

Los LCT se indujeron mediante un método de vacunación, utilizando los 16 tipos de péptidos 9-meros y 10-meros (Id. de Sec. N°: 26 a 41) predichos en el Ejemplo 6 en ratones transgénicos que expresan HLA humano (A0201) (Hum. Immunol. 2000 Aug.; 61 (8): 764-79 Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA-A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response., BenMohamed L., Krishnan R., Longmate J., Auye C., Low L., Primus J., y Diamond DJ.).

Se obtuvieron ratones BALB/C (H-2^d) de seis a ocho semanas de edad de CLEA Japan. Los ratones transgénicos A2/Kb (RTG) fueron proporcionados por F. Jim Primus, Ph. D. del Centro de Cáncer Vanderbilt-Ingram. Los linfocitos T2 (deficientes para TAP y HLA-A*0201-positivos) fueron proporcionados por el Prof. H. Shiku de la Universidad de Mie, Tercer Departamento de Medicina Interna.

La médula ósea se recogió del fémur y tibia del ratón, y se retiraron los linfocitos y granulocitos utilizando anticuerpos anti-CD4, CD8, Gr-1 (Beckton-Dickinson), anticuerpo anti-B220 (Bioscience) y complemento de conejo (PeL- Freez). Las células obtenidas se cultivaron en una placa de 6 pocillos. Las células en suspensión se recogieron al día siguiente en medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con FBS al 10% en otra placa de 6 pocillos, a la que se le añadió 1000 U/mL de GM-CSF de ratón (proporcinado por Kirin Brewery) y 1000 U/mL de IL-4 de ratón (PEPRO TECH). Tres días después, se cambió la mitad del medio anterior, y dos días después, las células se cultivaron durante 20 horas en 10 µg/mL de OK- 432. Las células en suspensión resultantes se utilizaron como CD. Las CD se hicieron reaccionar con anticuerpos marcados con FITC anti-Clase II y CD40, y anticuerpos marcados con PE anti-Clase I, CD11c, CD80, y CD86 (todos de Beckton-Dickinson), y se confirmó que eran CD mediante análisis de los antígenos de superficie mediante FACS-Calibur (Beckton- Dickinson) utilizando el programa Cell Quest.

Después, 100 µg de cada péptido, 140 µg de péptido ayudante HbcAg120-140, y 100 µL de IFA se mezclaron (200 µL en total). La mezcla se administró por vía subcutánea en el abdomen derecho el día 0, y en el abdomen izquierdo el día 11. Se recogieron los bazos de los ratones vacunados el día 21, los eritrocitos se eliminaron hemolíticamente utilizando el tampón de lisis rojo (Sigma), y se utilizó una porción de las células como células respondedoras para el ensayo IFN-γ ELISPOT. El resto de células se colocaron en una placa de 24 pocillos (Corning) a 6x10⁶ células/pocillo con células de soporte en una proporción de 3:1, y se estimularon de nuevo. Se midió la citotoxicidad cinco días después. Los esplenocitos libres de eritrocitos, que derivaban de los ratones singénicos, se cultivaron durante tres días en presencia de 25 µg/mL de lipopolisacárido (LPS) para utilizar como células de soporte.

En este Ejemplo, el método IFN-γ ELISPOT se utilizó para evaluar la inducibilidad de los LCT de acuerdo con los puntos (SPOT) producidos por las células productoras de IFN-γ. Se trató una placa de 96 pocillos de fondo plano MAHA S45 (Millipore) a 4°C durante la noche con anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ de ratón (Pharmingen). Al día siguiente, se lavó la placa con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, y después se hizo reaccionar con un tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante dos horas. Después de esto, se añadieron las células T2 pulsadas y no pulsadas con péptido a cada pocillo a 10⁵ células/ 100 µL. Los esplenocitos de los ratones vacunados se añadieron a cada pocillo a un máximo de 4x 10⁶ células/ 100 µL (200 µL en total), y se cultivaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, cada pocillo se lavó, y se hizo reaccionar durante dos horas con anticuerpos biotinilados de rata anti-IFN-γ-de ratón (Pharmingen). Tras lavar la placa extensivamente, se añadió Extravidina a cada pocillo y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante dos horas. Tras lavar, se añadió sustrato conjugado de fosfatasa alcalina (BIO-RAD) a los pocillos, que se dejó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Los puntos azules resultantes de la producción de IFN-γ se midieron utilizando liberación compacta KS ELISPOT (Carl Zeiss).

Los puntos azules específicos se determinaron como:

Puntos azules específicos =(TISI(+))SPOT-TISI(-)SPOT)

Aquellos que cumplen la siguiente condición se consideraron efectivos:

TISI(+))SPOT/ TISI(-)SPOT ≥ 2

Como resultado, se obtuvieron cinco tipos de péptidos epítipo, Id. de Sec. N°: 29 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR775), Id. de Sec. N°: 30 (KDR773), Id. de Sec. N°: 33 (KDR772), Id. de Sec. N°: 34 (KDR1328), y Id. de Sec. N°: 40 (KDR190) mediante el ensayo ELISPOT de IFNγ(Tabla 5).

Tabla 5* Análisis ELISPOT

					ANÁLISIS ELISPOT X 40 (SFC)				
5	Id. de	INICIO POSICIÓN	SECUENCIA	AFINIDAD	RATÓN1		RATÓN2		
					Sec. N°:	AA	DE UNIÓN	pep(+)	pep(-)
10	26	KDR	1093	VLLWEIFSL*2	1792	5	8	7	1
	41	KDR	1094	LLWEIFSLGA*2	1092	0	0	0	0
	27	KDR	633	SLQDQGDYV*2	769	0	0	0	0
	28	KDR	5	VLLAVALWL*2	739	6	0	7	3
	29	KDR	775	AMFFWLLL	427	95	32	322	17
15	30	KDR	773	VIAMFFWLL	270	171	6	193	1
	31	KDR	1034	ILLSEKNVV*2	179	0	0	0	0
	32	KDR	604	KNLDTLWKL*2	128	0	7	0	0
	33	KDR	772	AVIAMFFWL	113	88	19	143	31
	34	KDR	1328	ELIEIGVQT	107	0	0	81	5
20	35	KDR	698	IMWFKDNET*2	76	0	0	0	0
	36	KDR	608	TLWKLNA T M*2	41	0	0	0	0
	37	KDR	491	FQGGNKIEV*2	32	0	0	0	0
	38	KDR	435	YQYGTI Q TL*2	32	0	0	0	0
	39	KDR	505	ALIEGKNKT*2	31	0	0	0	0
25	40	KDR	190	YMISYAGMV	30	122	6	33	11
	53	CEA5	588 ^{*1}	DVLYGPD T PI	0,25	229	2	230	6

^{*1} Tanaka H et al.: Póster presentado en AACR 2001

30 *2 los péptidos se listan sólo a modo informativo.

[Ejemplo 8] Confirmación del efecto antitumoral *in vivo* -- 1

35 Se recogió la médula ósea de ratones macho BALB/c de seis a ocho semanas de edad (CLEA Japan, Inc.) con el mismo motivo de anclaje que el HLA-A2402 humano. Como en el Ejemplo 7, se añadieron GM-CSF (Kirin Brewery) (1000 U/mL) e IL-4 (Genzyme) (1000 U/mL) a la médula ósea y se cultivaron para preparar células dendríticas. Las células dendríticas se sometieron a un pulso con el péptido de Id. de Sec. N°: 5 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR189) y después se administró (1x 10⁶ células/ ratón) dos veces a nueve ratones BALB/c en el cuadrante inferior derecho, con un intervalo de siete días. Siete días después, se inoculó la línea celular de cáncer de colon (5x 10⁵ células), Colon 26 (Taiho Pharmaceutical), en los abdomenes derechos de los ratones, y se analizaron las supervivencias de los ratones y el crecimiento tumoral.

45 Primero, se analizó la expresión de KDR mediante RT-PCR, como se indica en la Fig. 3, para confirmar que la KDR no se expresa sólo en las células Colon 26, sino que se expresa en los tejidos tumorales de los ratones inoculados con Colon 26. Más específicamente, se confirmó la aparición de los vasos tumorales en los tejidos tumorales, y para formar el tumor.

50 La Fig. 3 muestra la curva de supervivencia de los ratones inoculados con Colon 26. 35 días después de la inoculación del tumor, dos de nueve ratones sobrevivieron cuando se administró como control HBSS sola (100 µL) (Solución salina equilibrada de Hank); cinco de nueve ratones sobrevivieron cuando se inocularon con células dendríticas que no fueron pulsadas con péptidos; y los nueve ratones sobrevivieron cuando se inocularon con células dendríticas pulsadas con el péptido de Id. de Sec. N°: 5.

55 La Fig. 4 muestra el efecto en el crecimiento de los tumores derivados de Colon 26 en ratones. En comparación con el control, se observaron efectos supresores en el crecimiento tumoral cuando se inocularon células dendríticas, y se observaron efectos de supresión remarcables cuando se inocularon células dendríticas pulsadas con el péptido de Id. de Sec. N°: 5.

60 [Ejemplo 9] Búsquedas de homología para los péptidos de esta invención

65 Se llevaron a cabo búsquedas de homología para los péptidos de esta invención (Id. de Sec. N°: 2 (en el que la posición del aminoácido de iniciación es KDR1318), Id. de Sec. N°: 3 (KDR220), Id. de Sec. N°: 5 (KDR189), Id. de Sec. N°: 8 (KDR169), Id. de Sec. N°: 11 (KDR826), Id. de Sec. N°: 30 (KDR773), y Id. de Sec. N°: 40 (KDR190)) utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). No se pudieron encontrar péptidos con una secuencia completamente idéntica a ninguno de estos péptidos (Tabla 6). Los péptidos 9-meros (KDR169) de Id. de Sec. N°: 8 capaces de inducir una fuerte actividad LCT en el Ejemplo 4 poseen sólo una secuencia que

contenía dos faltas de coincidencia (homología del 77,8%), y dos secuencias que contenían tres faltas de coincidencia (homología del 66,7%). El péptido de Id. de Sec. N°: 5 (KDR189), cuyo remarcable efecto antitumoral *in vivo* se observó en el Ejemplo 8, posee sólo una secuencia que contenía tres faltas de coincidencia (homología del 66,7%).

5

Tabla 6 Análisis de homología utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)

	KDR169	KDR189	KDR826	KDR220	KDR1318	KDR773	KDR190
10	IDENTIDAD (9/9)	0	0	0	0	0	0
	IDENTIDAD (8/9)	0	0	3	0	0	0
	IDENTIDAD (7/9)	1	0	2	0	2	0
	IDENTIDAD (6/9)	2	1	-	0	-	2
15	[Ejemplo 10] Confirmación de efecto antitumoral <i>in vivo</i> -- 2						

Se recogió la médula ósea de ratones macho A2/Kb transgénicos (RTG) de seis a ocho semanas de edad que expresan el HLA-A0201 humano. Como en el Ejemplo 8, se añadieron GM-CSF (Kirin Brewery) (1000 U/mL) e IL-4 (Genzyme) (1000 U/mL) a la médula ósea y después se cultivaron para preparar células dendríticas. Las células dendríticas se sometieron a un pulso con el péptido de Id. de Sec. N°: 30 (posición del aminoácido de iniciación en KDR773), y se administraron (1×10^6 células/ ratón) dos veces en el cuadrante inferior izquierdo de doce ratones transgénicos A2/Kb, con un intervalo de siete días. Siete días después, se inocularon células de melanoma B16 (ATCC) (1×10^6 células) en el abdomen derecho del ratón, y se analizaron las supervivencias y el crecimiento tumoral de los ratones.

20

La Fig. 5 muestra la tasa de supervivencia de los ratones inoculados con B16. 35 días después de la inoculación tumoral, ocho de doce ratones sobrevivieron cuando se administró HBSS sólo (100 µL) como control; once de doce ratones sobrevivieron cuando se inocularon con células dendríticas que no fueron pulsadas con péptidos; y los doce ratones sobrevivieron cuando se inocularon con células dendríticas pulsadas con el péptido de Id. de Sec. N°: 30.

25

La Fig. 6 muestra el efecto en el crecimiento de los tumores derivados de B16 en ratones. En comparación con el control, se observaron efectos supresores en el crecimiento tumoral cuando se inocularon células dendríticas, y se observaron efectos de supresión remarcables cuando se inocularon células dendríticas pulsadas con el péptido de Id. de Sec. N°: 30.

30

[Ejemplo 11] Actividad citotóxica frente a las células forzadas a expresar KDR

35

Utilizando adenovirus, se forzó la expresión de KDR (véase, J. Biol. Chem. 1994 Oct 28; 269 (43): 26988-95) en una cepa HT29 de cáncer de colon humano HLA-A24-positivo (ATCC), de acuerdo con el método descrito por Miyake, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 1320-1324 (1996). Más específicamente, basado en la titulación determinada por el ensayo de placas de las células 293 humanas, las células se infectaron en una multiplicidad específica. Las células HT29 se plaquearon a una densidad celular de 10^5 células en un disco de 60 mm, y se incubaron durante 24 horas. Al día siguiente, se retiró el medio y se cambió con 200 µL de virus diluidos continuamente con medio fresco. Las células se incubaron a 37°C durante una hora, y después se añadió medio de crecimiento a las células, que se cultivaron durante 48 horas para usarse como células diana. Se utilizó como control la cepa HT29 HLA-A24-positiva, forzada por los adenovirus a expresar EGFP (véase, Leukemia 1999 Apr; 13 (4): 605-13). Las cepas HT29 forzadas a expresar KDR y EGFP, respectivamente, pueden presentar potencialmente péptidos parciales de cada proteína en sus correspondientes superficies celulares.

40

45

Utilizando el clon de LCT C29-169, inducido a partir del péptido de Id. de Sec. N°: 8 (posición del aminoácido de iniciación en KDR169), como se describe en el Ejemplo 3, que se une a HLA-A24, el efecto citotóxico sobre las células HT29 HLA-A24-positivas forzadas a expresar KDR se midió mediante el ensayo de liberación de cromo. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

50

La actividad citotóxica se midió mediante el ensayo de liberación de ^{51}Cr durante cuatro horas. Las células diana se cultivaron en una placa de 6 pocillos a una concentración de 1×10^6 células/ pocillo durante 24 horas, infectadas con adenovirus en los que se había insertado KDR o EGFP (Ad-KDR o Ad-EGFP) a una MDI de 50, y se utilizaron tras 48 horas. Las células diana se marcaron con 100 PCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ a 37°C durante una hora, y se lavaron tres veces con RPMI1640. Se añadieron las células diana (1×10^4 células/ 100 µL) y 100 µL de células efectoras a varias concentraciones (200 µL en total) a una placa microtitulada de 96 pocillos en forma de U (Corning), y se cultivaron en un incubador de CO_2 a 37°C durante cuatro horas. Tras el cultivo, se recogió 100 µL de sobrenadante de cada pocillo y se midió utilizando un contador y para calcular la citotoxicidad de la misma forma que en el Ejemplo 2.

55

60

Como resultado, como se muestra en la Fig. 7, el clon LCT C29-169 mostró un efecto citotóxico muy remarcable hacia HT29 HLA-A24-positivas que expresan de forma forzada KDR, en comparación con las células que expresan de forma forzada EGFP.

65

[Ejemplo 12] Actividad citotóxica frente a células que expresan endógenamente KDR

El efecto citotóxico del clon LCT C29-169 descrito en el Ejemplo 3, frente a la cepa KT5 HUVEC, derivada de células endoteliales vasculares del cordón umbilical humano HLA-A24-positivas que expresan endógenamente KDR, se analizaron utilizando cepas HUVEC KDR-positivas y HLA-A24-negativas, y P8 como control. Estas células presentan péptidos parciales de KDR en su superficie celular.

La actividad citotóxica se midió mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de cuatro horas. Las células diana se marcaron con 100 PCi de Na₂⁵¹CrO₄ a 37°C durante una hora, y se lavaron tres veces con RPMI1640. Se añadieron las células diana (1x 10⁴ células/ 100 µL) y 100 µL de células efectoras a varias concentraciones (200 µL en total) a una placa microtitulada de 96 pocillos en forma de U (Corning), y se cultivaron en un incubador de CO₂ a 37°C durante cuatro horas. Tras el cultivo, se recogió 100 µL de sobrenadante de cada pocillo y se midió utilizando un contador y para calcular la citotoxicidad, de la misma forma que en el Ejemplo 2.

Como aparece en los resultados de la Fig. 8, el clon LCT C29-169 mostró un efecto citotóxico frente a HUVEC HLA-A24-positiva que expresan endógenamente KDR, y mostró un débil efecto citotóxico frente a HUVEC HLA-A24-negativa.

[Ejemplo 13] Establecimiento de clones LCT utilizando péptidos de unión a HLA-A0201

Utilizando el péptido de Id. de Sec. N°: 40 (posición del aminoácido de iniciación en KDR190), el péptido KDR773-2L (Id. de Sec. N°: 54) en el que el segundo aminoácido del N terminal en el péptido de Id. de Sec. N°: 30 (KDR773) se ha convertido a leucina, el péptido de Id. de Sec. N°: 29 (KDR775), el péptido de Id. de Sec. N°: 34 (KDR1328), y el péptido de Id. de Sec. N°: 33 (KDR772), que se une a HLA-A0201 y que se determinaron que eran efectivos según el análisis ELISPOT del Ejemplo 7, se obtuvieron dos tipos (KWC14-190 y KWC65-190), cuatro tipos (KWC44-773-2L, KWC76-773-2L, KWC129-773-2L, y KWC134-773-2L), dos tipos (KWC81-775 y KWC85-775), doce tipos (KWC16, KWC21, KWC22, KWC47, KWC51, KWC108, KWC117, KWC132, KWC151, KWC153, KWC156, y KWC159), y un tipo (KWC72-772) de clones LCT, respectivamente, como en el Ejemplo 3. Las correspondientes citotoxicidades se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

ACTIVIDAD CITOTÓXICA				
		X 20	X 2	
NOMBRE DEL CLON	Pep(+)	Pep(-)	Pep(+)	Pep(-)
KWC14-190	43%	0%	9%	0%
KWC65-190	83%	0%	27%	0%
KWC44-773-2L	87%	0%	64%	0%
KWC76-773-2L	83%	2%	68%	1%
KWC129-773-2L	89%	0%	82%	1%
KWC134-773-2L	89%	2%	54%	2%
KWC81-775	86%	0%	64%	0%
KWC85-775	90%	0%	63%	0%
KWC16	95%	0%	85%	0%
KWC21	100%	0%	91%	0%
KWC22	93%	0%	77%	0%
KWC47	109%	2%	87%	1%
KWC51	101%	0%	93%	1%
KWC108	71%	2%	23%	2%
KWC117	83%	0%	42%	0%
KWC132	102%	0%	55%	0%
KWC151	102%	0%	101%	0%
KWC153	47%	0%	18%	0%
KWC156	64%	0%	23%	0%
KWC159	93%	0%	86%	0%
KWC72-772	101%	0%	67%	0%

Como aparece en los resultados de la Tabla 7, los péptidos de Id. de Sec. N°: 29, 33, 34, y 40, así como el péptido de Id. de Sec. N°: 54, en el que el segundo aminoácido del N terminal en el péptido de Id. de Sec. N°: 30 es leucina, pueden todos inducir a los LCT con una citotoxicidad remarcable, y mostraron así ser efectivos como péptidos epítopo.

[Ejemplo 14]

5 El péptido de Id. de Sec. N°: 29 (posición del aminoácido de iniciación en KDR775) se añadió a una cepa T2 HLA-A0201-positiva para producir una célula diana. Utilizando la célula, el efecto citotóxico del clon LCT (KDR C85-775 (KWC85-775)) obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 29 en el Ejemplo 13 se analizó mediante ensayo de liberación de cromo.

10 En los resultados, mostrados en la Fig. 9, el clon LCT C85-775 (KWC85-775) mostró claramente un efecto citotóxico frente a células HLA-A0201-positivas que presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 29. Por contra, no se observó en absoluto efecto citotóxico frente a células control que no presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 29.

[Ejemplo 15]

15 El efecto citotóxico del clon LCT (KDR C85-775 (KWC85-775)) frente a la línea celular de carcinoma hepatocelular HePG2 HLA-A0201-positivo, forzado a expresar KDR por los adenovirus, se examinó mediante ensayo de liberación de cromo. HePG2 HLAA0201-positivo forzado a expresar EGFP se utilizó como control.

20 En los resultados, mostrados en la Fig. 10, el clon LCT KDR C85-775 (KWC85-775) mostró un alto efecto citotóxico remarcable frente a células HLA-A0201-positivas que presentan péptidos KDR en la superficie, en comparación con la actividad frente a células que presentan el péptido EGFP.

[Ejemplo 16]

25 El péptido de Id. de Sec. N°: 34 (posición del aminoácido de iniciación en KDR1328) se añadió a la cepa T2 HLA-A0201-positiva para producir células diana. Utilizando estas células, el efecto citotóxico del clon LCT (KDR C51-1328 (KWC51)) obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 34 en el Ejemplo 13 se examinó mediante ensayo de liberación de cromo.

30 En los resultados, mostrados en la Fig. 11, el clon LCT KDR C51-1328 (KWC51) mostró claramente un efecto citotóxico frente a células HLA-A0201-positivas que presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 34. Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico frente a células control que no presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 34.

[Ejemplo 17]

35 El efecto citotóxico del clon LCT (KDR C51-1328 (KWC51)) frente a la línea celular de carcinoma hepatocelular HePG2 HLA-A0201-positiva, forzada a expresar KDR por los adenovirus, se examinó mediante ensayo de liberación de cromo. Se utilizó como control HePG2 HLAA0201-positivas forzadas a expresar EGFP.

40 En los resultados, mostrados en la Fig. 12, el clon LCT KDR C51-1328 (KWC51) mostró un alto efecto citotóxico remarcable frente a células HLA-A0201-positivas que presentan péptidos KDR en la superficie, en comparación con la actividad frente a células que presentan el péptido EGFP.

[Ejemplo 18]

45 El péptido de Id. de Sec. N°: 54 (KDR773-2L), en el que el segundo péptido de Id. de Sec. N°: 30 se convierte en una leucina, se añadió a una cepa T2 HLA-A0201-positiva para producir células diana. Utilizando estas células, el efecto citotóxico del clon LCT (KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L)) obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 54 en el Ejemplo 13 se examinó mediante ensayo de liberación de cromo. La Fig. 13 muestra los resultados.

50 En los resultados, mostrados en la Fig. 13, el clon LCT KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L) mostró claramente un efecto citotóxico frente a células HLA-A0201-positivas que presentan KDR773-2L. Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico frente a células control que no presentan KDR773-2L.

[Ejemplo 19]

55 El efecto citotóxico del clon LCT (KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L)) obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 54 (KDR773-2L), en el que el segundo péptido de Id. de Sec. N°: 30 se ha convertido en una leucina, se examinó mediante ensayo de liberación de cromo utilizando la cepa T2 HLA-A0201-positiva pulsada con el péptido no modificado de Id. de Sec. N°: 30 (posición del aminoácido de iniciación en KDR773) como célula diana.

60 En los resultados, mostrados en la Fig. 14, los clones LCT obtenidos mediante estimulación con el péptido modificado pudieron reconocer y dañar el péptido post-modificación.

[Ejemplo 20]

65 El efecto citotóxico del clon LCT (KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L)) frente la línea celular de carcinoma

hepatocelular HePG2 HLA-A0201-positiva, forzada a expresar KDR por los adenovirus, se examinó mediante ensayo de liberación de cromo. Se utilizó como control HePG2 HLA-A0201-positivo forzado a expresar EGFP.

5 En los resultados, mostrados en la Fig. 15, el clon LCT KDR C44-773-2L (KWC44-773-2L) mostró un alto efecto citotóxico remarcable frente a células HLA-A0201-positivas que presentan péptidos KDR en la superficie, en comparación con la actividad frente a células que presentan el péptido EGFP.

[Ejemplo 21]

10 Los presentes inventores determinaron si diferentes anticuerpos pueden bloquear el efecto citotóxico del clon LCT (KDR C51-1328 (KWC51)), obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 34, frente a la línea celular de carcinoma hepatocelular HePG2 HLA-A0201-positiva, forzada a expresar KDR por los adenovirus.

15 En los resultados, mostrados en la Fig. 16, la función citotóxica se inhibió mediante un anticuerpo anti-HLA de Clase I frente a antígenos de HLA mostrados por las células diana, y anticuerpo anti-CD8 frente a CD8 utilizado como marcador de linfocitos T citotóxicos.

[Ejemplo 22] Examinación de la actividad inhibidora de la angiogénesis mediante el ensayo del saco aéreo dorsal (DAS)

20 La presente actividad inhibidora de la angiogénesis de péptidos epítipo se evaluó en ratones utilizando un ensayo DAS (véase, Clinical Cancer Research, Vol. 5, 2185-2191, Agosto 1999; Cancer Research 62, 6116-6123, Noviembre 1, 2002).

25 Específicamente, un filtro de membrana se fijó a ambos lados de una cámara en anillo, y se esterilizó con óxido de etileno gas. Se prepararon las células de melanoma B16 a 5×10^5 células/ 0,15 mL, y se inyectaron en la cámara. Los ratones (ratones transgénicos A2/kb (derivados de B16)) se inmovilizaron cara abajo, y se produjo un saco de aire al inyectar de 5 a 10 mL de aire en la hipodermis dorsal murina utilizando una jeringa. Se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en la parte inferior del saco. La cámara en anillo, se rellenó con una solución de células en suspensión, se implantó en la hipodermis dorsal, y se cerró la piel utilizando una grapa de piel. Seis días después del implante, la piel del ratón se retiró junto con la cámara, se fijó de forma extendida, y se marcó con un anillo de goma negra para observar los vasos sanguíneos formados de nuevo utilizando un microscopio. Los vasos sanguíneos nuevamente formados mediante los factores angiogénicos liberados por las células tumorales malignas, característicamente discurren en forma de zigzag, y son morfológicamente diferentes de los vasos sanguíneos que aparecen de forma natural. Por lo tanto, los vasos sanguíneos de 3 mm o más dentro del anillo de goma y que discurren en forma de zigzag se determinaron como vasos sanguíneos de nueva formación, y se analizaron utilizando un índice de angiogénesis (IA). El IA se analiza en seis niveles, de 0 a 5 de acuerdo con el número de vasos sanguíneos tortuosos. Todos aquellos con cinco o más vasos sanguíneos tortuosos se calificaron como 5.

40 La vacunación se realizó 14 días antes de la implantación de la cámara, y se repitió al cabo de una semana (un total de dos veces) inyectando respectivamente 5×10^4 células de HBSS, CD solas, o CD pulsadas con péptido, en la vena de la cola. Los resultados se muestran en la Fig. 17 y en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8. Efecto del ensayo DAS

45

INOCULACIÓN	PÉPTIDO DE ESTIMULACIÓN	ÍNDICE ANGIOGÉNESIS (IA)	P
VEHÍCULO	-	(0,7 ± 0,2)	
HBSS	-	(4,5 ± 0,2)	
CD	NINGUNO	(4,2 ± 0,4)	
CD	KDR190 (Id. de Sec. N°: 40)	(3,6 ± 0,5)	0,3453
CD	KDR772 (Id. de Sec. N°: 33)	(2,8 ± 0,5)	0,0346
CD	KDR773 (Id. de Sec. N°: 30)	(2,2 ± 0,7)	0,0034
CD	KDR773-2L (Id. de Sec. N°: 54)	(1,3 ± 0,8)	0,0001
CD	KDR775 (Id. de Sec. N°: 29)	(2,2 ± 0,5)	0,0007
CD KDR1084	(Id. de Sec. N°: 46)	(1,7 ± 0,3)	<0.0001

La Fig. 17 y la Tabla 8 muestran que la formación de vasos sanguíneos tortuosos se suprimió claramente en los grupos vacunados con CD pulsadas con los péptidos de Id. de Sec. N°: 40 (posición del aminoácido de iniciación en KDR190), Id. de Sec. N°: 33 (KDR772), Id. de Sec. N°: 30 (KDR773), Id. de Sec. N°: 54 (KDR773-2L), Id. de Sec. N°: 29 (KDR775), e Id. de Sec. N°: 46 (KDR1084), respectivamente, en comparación con el grupo al que se administró CD solas. Esto indicó un efecto inhibitor de la angiogénesis estadísticamente significativo.

Se analizó la curación de heridas y la fertilidad en ratones vacunados para observar los efectos adversos de la vacunación utilizando estos péptidos epítipo en la angiogénesis fisiológica normal. No obstante, no se encontraron efectos adversos significativos en los ratones vacunados. Además, utilizando los clones de LCT que reconocen los péptidos KDR, se analizó la citotoxicidad frente a células endoteliales no proliferativas o proliferativas *in vitro* para examinar los efectos adversos en humanos. Como resultado, estos clones mostraron una actividad más fuerte frente a células endoteliales proliferativas que frente a células endoteliales no proliferativas.

[Ejemplo 23]

Utilizando los ratones transgénicos A2/Kb que expresan el HLA-A0201 humano, los péptidos de Id. de Sec. N°: 30 (posición del aminoácido de iniciación en KDR773) y de Id. de Sec. N°: 34 (KDR1084) se mezclaron cada uno con adyuvante incompleto de Freund, después se administraron al día 3 y 13 a los ratones portadores de tumores de la cepa MC38 de cáncer de colon para indicar cambios en el volumen del tumor.

El efecto antitumoral *in vivo* en un modelo terapéutico de péptido de epítipo inmovilizado de HLA-A*0201 (KDR773) se analizó utilizando el área del tumor, utilizando el mismo método de vacunación como en el Ejemplo 22. El resultado, como aparece en la Fig. 18, confirma un efecto supresor significativo en el crecimiento tumoral por la vacunación con los péptidos de Id. de Sec. N°: 30 e Id. de Sec. N°: 34.

[Ejemplo 24]

El péptido de Id. de Sec. N°: 40 (posición del aminoácido de iniciación en KDR190) se añadió a la cepa T2 HLA-A0201-positiva para producir células diana. Utilizando estas células, se examinó el efecto citotóxico del clon LCT (KWC65-190) obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 40 en el Ejemplo 13 utilizando un ensayo de liberación de cromo.

En los resultados, mostrados en la Fig. 19, el clon LCT KWC65-190 mostró claramente un efecto citotóxico frente a células HLA-A0201-positivas que presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 40. Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico frente a células control que no presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 40.

[Ejemplo 25]

El péptido de Id. de Sec. N°: 33 (posición del aminoácido de iniciación en KDR772) se añadió a la cepa T2 HLA-A0201-positiva para producir células diana. Utilizando estas células, se examinó el efecto citotóxico del clon LCT (KWC72-772) obtenido del péptido de Id. de Sec. N°: 33 en el Ejemplo 13 utilizando un ensayo de liberación de cromo.

En los resultados, mostrados en la Fig. 20, el clon LCT KWC72-772 mostró claramente un efecto citotóxico frente a células HLA-A0201-positivas que presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 33. Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico frente a células control que no presentan el péptido de Id. de Sec. N°: 33.

[Ejemplo 26]

El efecto citotóxico del clon LCT (KWC72-772) frente a la línea celular de carcinoma hepatocelular HePG2HLA-A0201-positiva, forzada a expresar KDR por los adenovirus, se examinó mediante ensayo de liberación de cromo. Se utilizó HePG2 HLA-A0201-positiva forzada a expresar EGFP como control.

En los resultados, como se muestra en la Fig. 21, el clon LCT KWC72-772 mostró un alto efecto citotóxico remarcable frente a células HLA-A0201-positivas que presentan péptidos KDR en su superficie, en comparación con la actividad frente a células que presentan el péptido EGFP.

[Ejemplo 27]

Los péptidos de Id. de Sec. N°: 2 (posición del aminoácido de iniciación en KDR1318), Id. de Sec. N°: 3 (KDR220), Id. de Sec. N°: 5 (KDR189), e Id. de Sec. N°: 11 (KDR826) se añadieron a la cepa de linfocitos B humanos A24-LCL HLA-A24-positiva (HLA-A24/24, Takara Shuzo) para producir células diana. Utilizando estas células, los efectos citotóxicos de los clones LCT, C7-1318, KWC46, C18-189, y C65-826, descritos en el Ejemplo 3, se examinaron mediante ensayo de liberación de cromo.

En los resultados, mostrados en la Fig. 22 a 25, cada uno de los clones LCT, C7-1318, KWC46, C18-189, y C65-

826, mostró claramente un efecto citotóxico frente a cada una de las células HLA-A24-positivas que presentan los péptidos de Id. de Sec. N°: 2, 3, 5, y 11, respectivamente. Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico en absoluto o casi ninguno frente a cada una de las células control, que no presentaban los péptidos.

5 [Ejemplo 28]

10 Como para el Ejemplo 11, los efectos citotóxicos de los clones LCT, C7-1318, KWC46, C18-189, y C65-826, descritos en el Ejemplo 3, frente a la cepa HT29 de cáncer de colon humano (ATCC), forzada a expresar KDR por los adenovirus, se examinó mediante ensayo de liberación de cromo. La cepa HT29 HLA-A24-positiva forzada a expresar EGFP, se utilizó como control.

15 En los resultados, mostrados en las Fig. 26 a 29, todos los clones LCT, C7-1318, KWC46, C18-189, y C65-826, mostraron un alto efecto citotóxico remarcable frente a HT29 HLA-A24-positiva forzada a expresar KDR, en comparación con la actividad frente a células forzadas a expresar EGFP.

[Ejemplo 29]

20 Como para el Ejemplo 22, la actividad inhibidora de la angiogénesis de los péptidos epítomos frente a la respuesta angiogénica inducida por las células Colon 26 en ratones BALB/c se analizó mediante un ensayo DAS.

25 Como aparece en los resultados de las Fig. 30 y 31, en los grupos vacunados con CD pulsadas con los péptidos de Id. de Sec. N°: 5 (posición del aminoácido de iniciación en KDR189) y Id. de Sec. N°: 11 (KDR826), respectivamente, la formación de vasos sanguíneos tortuosos se suprimió claramente en comparación con el grupo al que se le administró CD solas. Esto indico un efecto supresor de la angiogénesis estadísticamente significativo.

[Ejemplo 30]

30 La respuesta de los LCT frente a cada tipo de los siguientes péptidos epítomo se investigó utilizando PBMC de pacientes con cáncer tras la estimulación con cada péptido:

35 Péptidos de Id. de Sec. N°: 8 (posición del aminoácido de iniciación en KDR169), Id. de Sec. N°: 5 (KDR189), Id. de Sec. N°: 3 (KDR220), Id. de Sec. N°: 11 (KDR826), e Id. de Sec. N°: 17 (KDR1318), con alta afinidad de unión por HLA-24; y péptidos de Id. de Sec. N°: 40 (KDR190), Id. de Sec. N°: 33 (KDR772), Id. de Sec. N°: 30 (KDR773), Id. de Sec. N°: 29 (KDR775), e Id. de Sec. N°: 34 (KDR1328), con alta afinidad de unión por HLA-A0201.

40 Utilizando el método escrito por Maeda, Y et al. en Br. J. Cancer 87, 796-804 (2002), se detectaron LCT específicos de péptido en PBMC. Primero, las PBMC recogidas de pacientes (1×10^5 células) se incubaron con $10 \mu\text{M}$ de cada péptido en una placa de 96 pocillos con el fondo en forma de U, que comprende $200 \mu\text{L}$ de medio. El medio consiste de medio RPMI1640 al 45%, medio AIM-V al 45%, FBS al 10%, 100 U/mL de interleuquina-2 (IL-2), y $0,1 \mu\text{M}$ de solución de aminoácidos no esenciales MEM. Cada tres días, la mitad del medio se retiró y se sustituyó con medio fresco que contenía el péptido correspondiente ($20 \mu\text{M}$). Tras la incubación durante doce días, se recogieron las células para analizar la capacidad de producir IFN- γ en respuesta a cada péptido. Cuando la cantidad de IFN- γ producida por las PBMC estimuladas por el péptido en respuesta al péptido correspondiente fue dos veces superior o más a la cantidad producida en respuesta al péptido control VIH, el péptido analizado se consideró positivo.

45 Estos resultados mostraron que el precursor de LCT se produce en pacientes de cáncer de tipo HLA-A2 y HLA-A24, así como en donantes sanos (Tabla 9). En la tabla, los pacientes A, B, y C son pacientes de tipo HLA-A24; y el paciente D es un paciente de tipo HLA-A02. Los pacientes A y D son pacientes con cáncer de colon; y los pacientes B y C son pacientes con melanoma. CMV se refiere a los péptidos derivados de citomegalovirus utilizados como control positivo. Los péptidos con alta afinidad de unión por A-24 se describen en Kuzushima, K. et al., Blood 2001, 98 (6): p1872-1881, y similares; y los péptidos con alta afinidad de unión por A-2 se describen en Solache, A. et al., J. of Immunol. 1999, 163 (10); p5512-5518, y similares.

50

Tabla 9 precursor de LCT derivados de pacientes con cáncer

	PACIENTE A		PACIENTE B		PACIENTE C		PACIENTE D	
	POZOS POSITIVOS	POZOS TOTALES						
CMV	1	32	1	24	0	16:	5	20
KDR 169	12	32	4	32	1	24	KDR 190	24
KDR 189	3	32	1	32	0	24	KDR 772	24
KDR 220	0	32	3	32	0	24	KDR 773	24
KDR 826	11	32	3	32	0	24	KDR 775	24
<u>KDR 1318</u>	<u>0</u>	<u>32</u>	<u>9</u>	<u>32</u>	<u>1</u>	<u>24</u>	<u>KDR 1328</u>	<u>24</u>

Como para el Ejemplo 14 y similares, se realizó un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr durante cuatro horas para establecer líneas de LCT de los precursores de LCT (Fig. 32).

Aplicabilidad Industrial

5 La presente invención proporciona péptidos para su utilización en el tratamiento o prevención de tumores, que inducen linfocitos T citotóxicos localizando las células endoteliales formadas en un amplio rango de tejidos tumorales, y que son extremadamente efectivos como vacunas contra el cáncer. La presente invención también proporciona fármacos para tratar y prevenir tumores, en los que los fármacos comprenden estos péptidos.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Oncotherapy Science, Inc.

15 <120> PÉPTIDOS KDR Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN

<130> L1360 EP/2 S3

20 <150> EP 03795432.8

<151> 2003-09-12

<150> JP 2002-267285<151> 2002-09-12

25 <150> JP 2003-062003<151> 2003-03-07

<150> JP 2003-167042<151> 2003-06-11

<160> 56

30 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu

1

5

<210> 2

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu

1

5

<210> 3

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val Leu

1

5

50 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 299 T3

	<400> 4	
		Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
		1 5
	<210> 5	
	<211> 9	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
		Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met
		1 5
	<210> 6	
	<211> 9	
10	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
		Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu Lys Leu
		1 5
	<210> 7	
	<211> 9	
15	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
		Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu
		1 5
	<210> 8	
	<211> 9	
20	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
		Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile
		1 5
	<210> 9	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 9	
		Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu
		1 5
	<210> 10	
	<211> 9	
	<212> PRT	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 10	

Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys Leu

1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 11

Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu

1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 12

Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile

1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 13

Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu

1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30

<400> 14

Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu

1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35

<220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40

<400> 15

ES 2 375 299 T3

Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 10 <400> 16
 Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20 <400> 17
 Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 30 <400> 18
 Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 40 <400> 19
 Thr Tyr Leu Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>

ES 2 375 299 T3

<221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile

1 5 10

5 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 21

Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe

1 5 10

15 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 22

Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile

1 5 10

25 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 23

Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile Ile Leu

1 5 10

35 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 24

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala

1 5 10

45 <210> 25

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 25
 Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 26
 Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 27
 Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 28
 Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu
 1 5
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 29
 Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 30
 Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 31

Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val

1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 32

Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys Leu

1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 33

Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu

1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 34

Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr

1 5

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

Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr

1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 36

Thr Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met

1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 37

Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val

1 5

<210> 38

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 38

Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 39

Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 40

Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val
 1 5

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

20

<220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 41

Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala
 1 5 10

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 42

Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys
 1 5 10

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

40

<220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45

<400> 43

Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val

1 5 10

5 <210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 44

Trp Leu Leu Leu Val Ile Ile Leu Arg Thr

1 5 10

15 <210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 45

Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val

1 5 10

25 <210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val

1 5 10

35 <210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 47

Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Ser Val

1 5 10

45 <210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 48

Leu Leu Leu Val Ile Ile Leu Arg Thr Val

1 5 10

10
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 49

Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val

1 5 10

20
 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 50

Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val

1 5 10

30
 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 51

Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val Lys Ile

1 5 10

40
 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 52

Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu

1 5 10

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

5

Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Ile

1 5 10

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 54

15

Val Leu Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu

1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val

1 5

<400> 55
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

30

<220>
 <221> fuente
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 56

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu

1 5

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un nonapéptido o decapeptido seleccionado de los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. Nº: 30, 29, 33, 34, 40, 46 o 54 para utilizar en el tratamiento o prevención de tumores.
2. Un nonapéptido seleccionado de los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. Nº: 2, 3, 5, 11 o 12 para utilizar en el tratamiento o prevención de tumores.
- 10 3. Una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento y/o prevención de tumores, en el que la composición farmacéutica comprende uno o más péptidos definidos en las reivindicaciones 1 o 2.
4. Una vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de tumores, en el que la vacuna comprende un péptido definido en las reivindicaciones 1 a 2 como un ingrediente activo.
- 15 5. La vacuna de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento o prevención de tumores, que se utiliza para su administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.
- 20 6. La vacuna de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento o prevención de tumores, que se utiliza para suprimir el crecimiento y/o metástasis de tumores malignos.

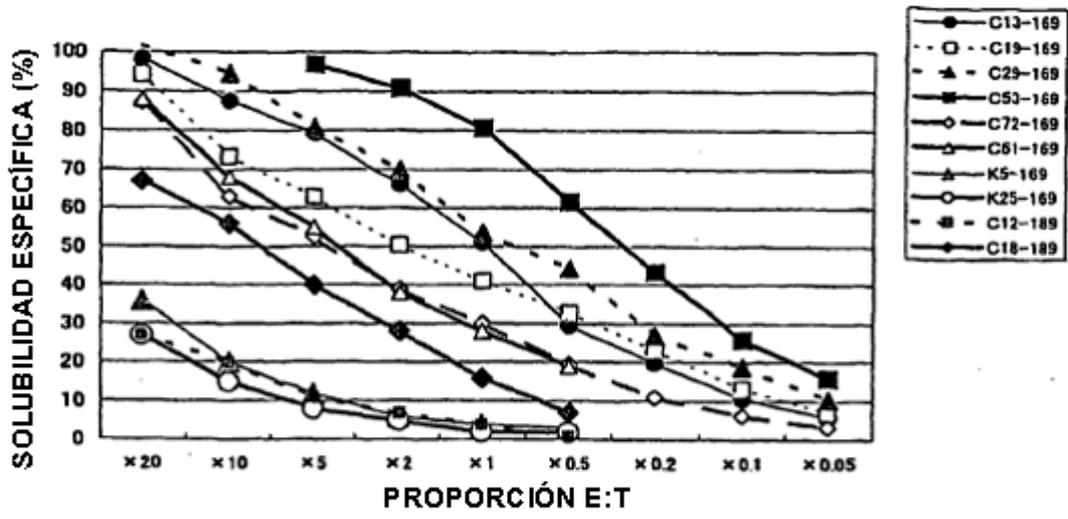


FIG. 1

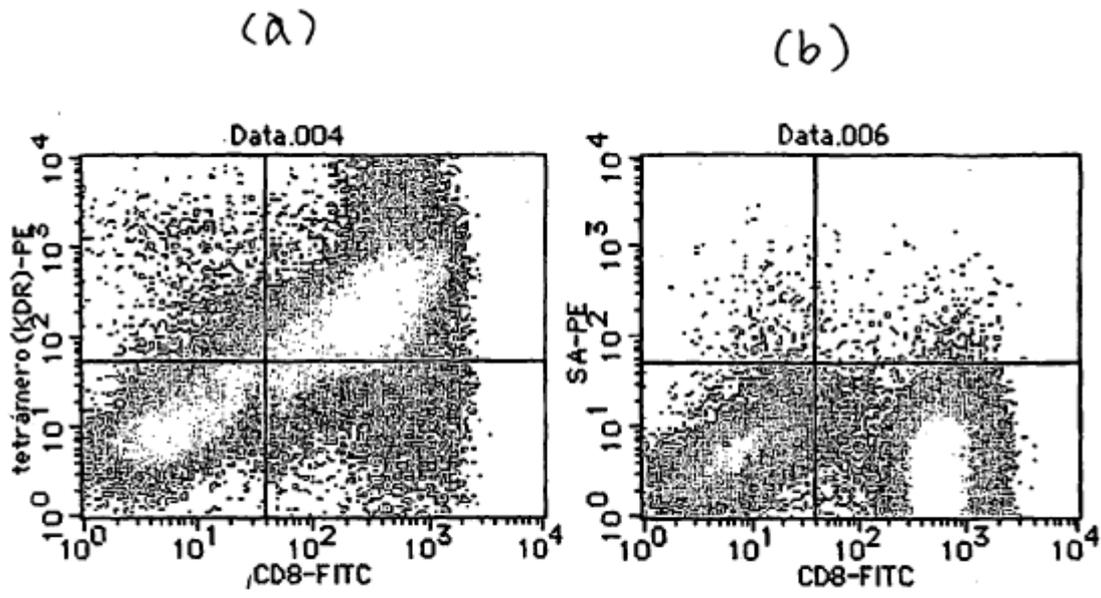


FIG. 2

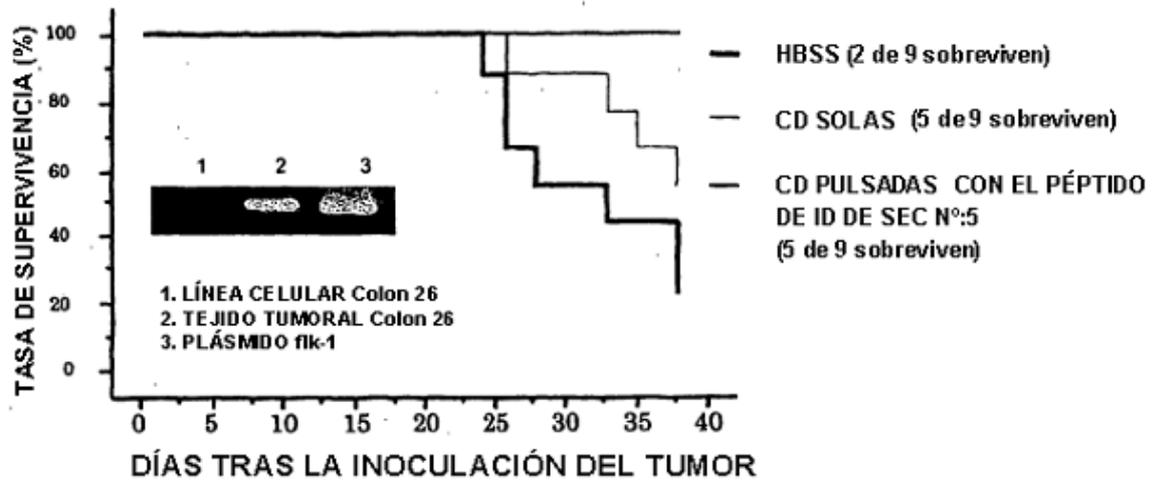


FIG. 3

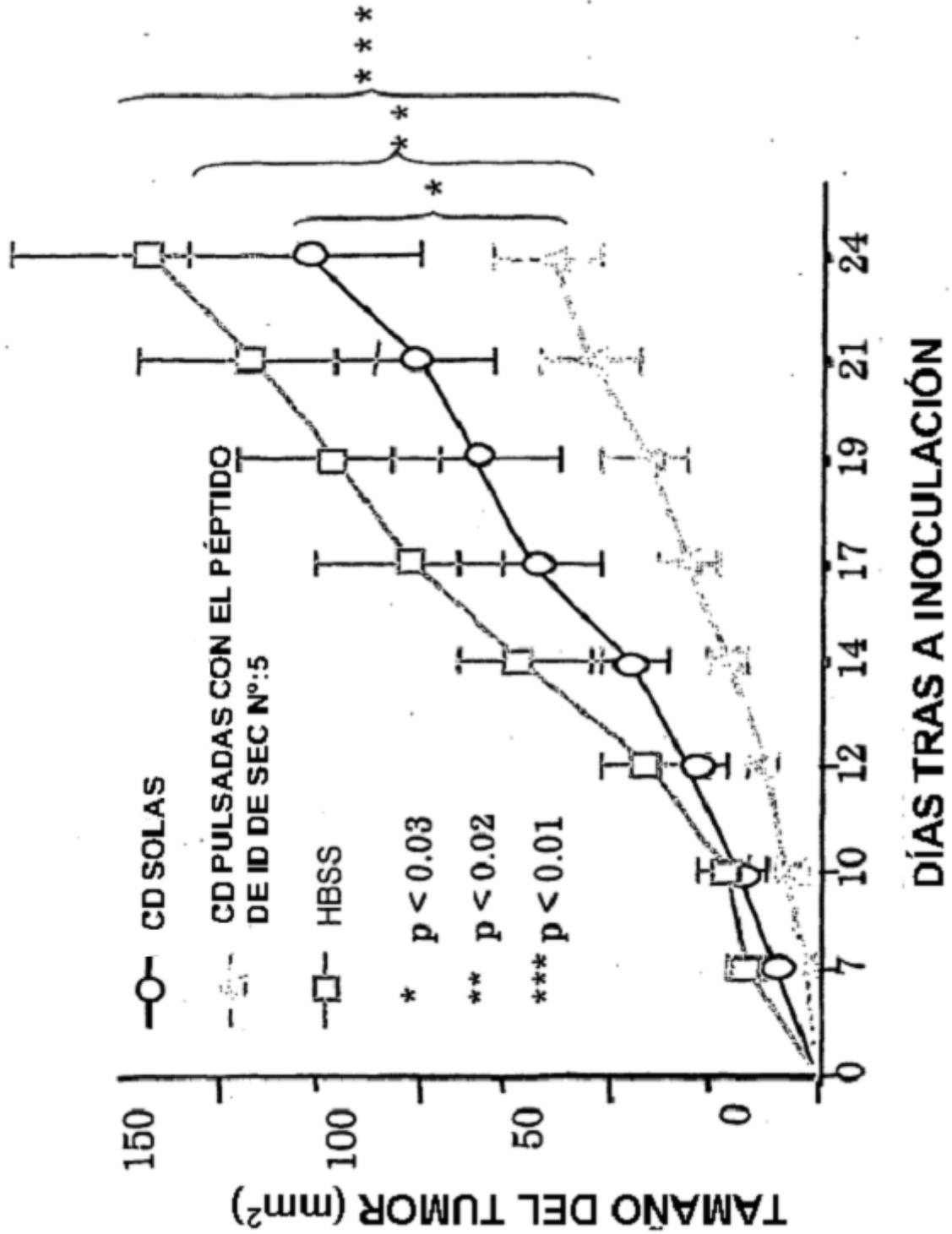


FIG. 4

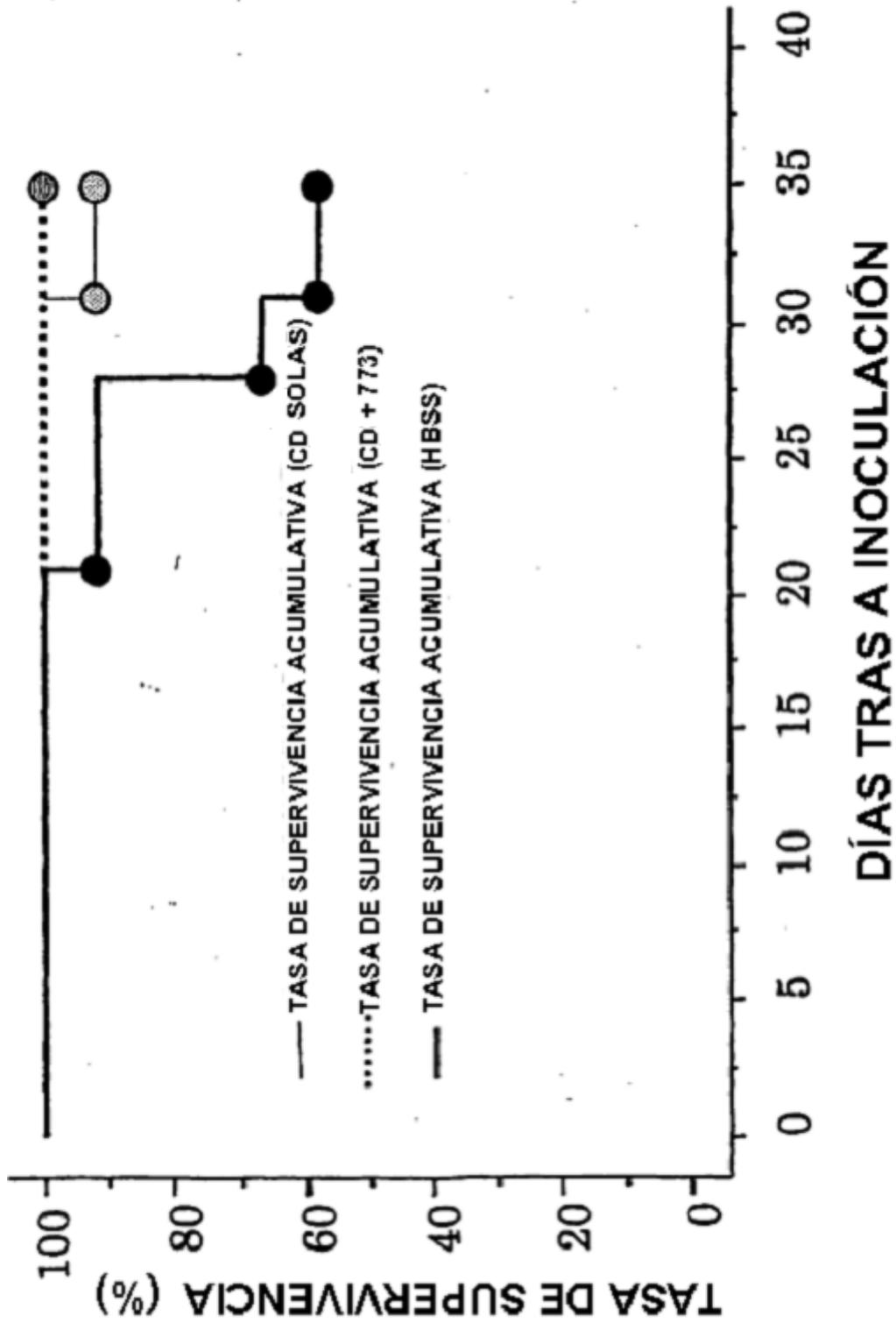


FIG. 5

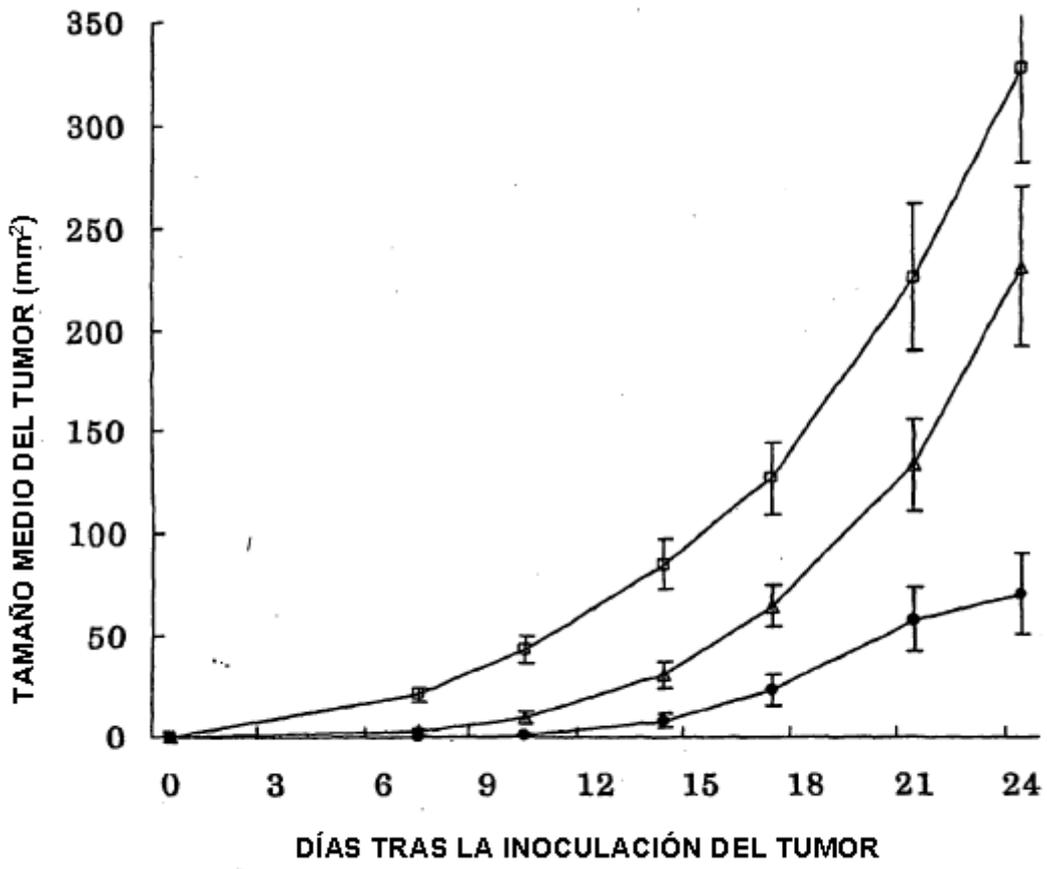


FIG. 6

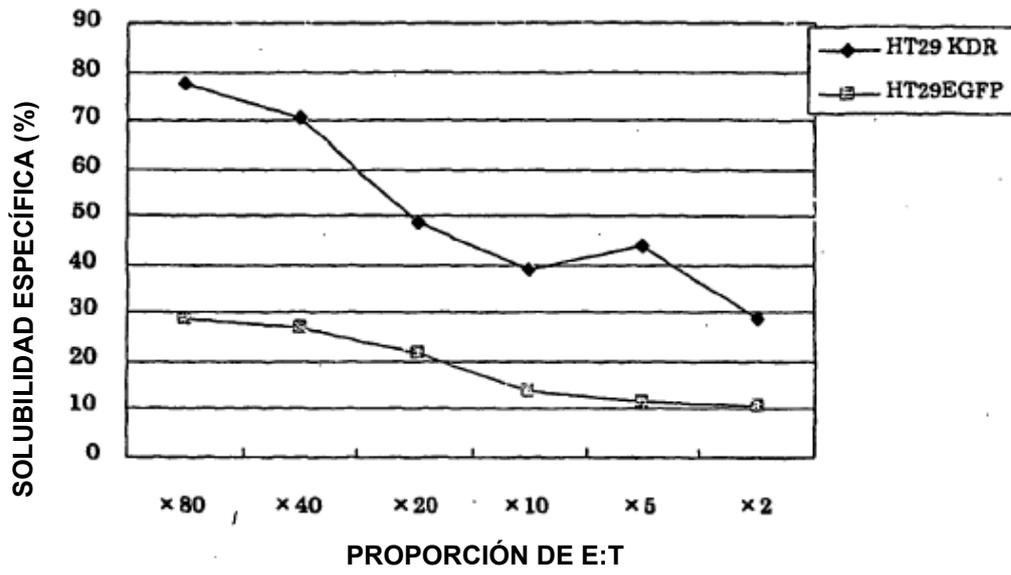


FIG. 7

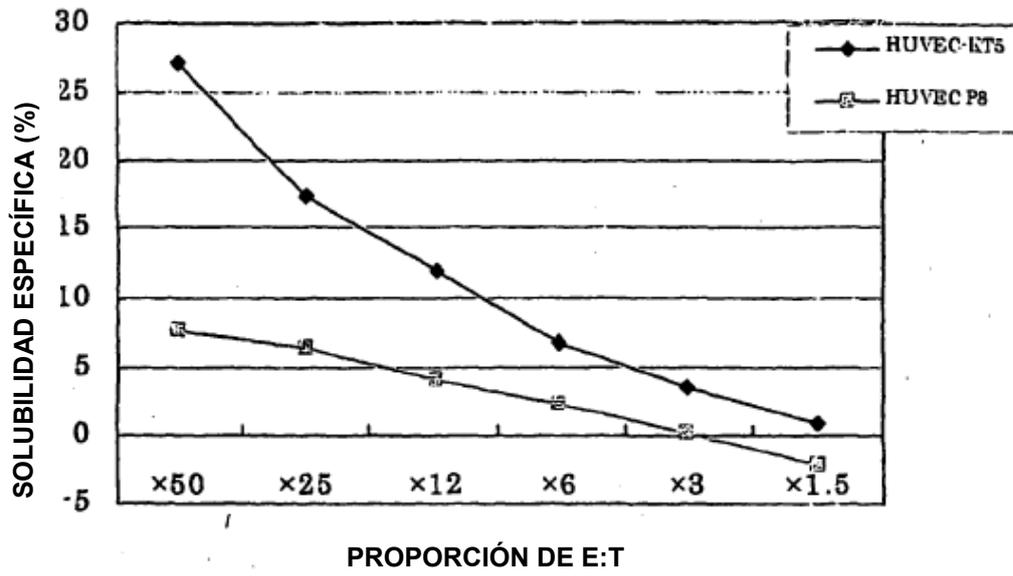


FIG. 8

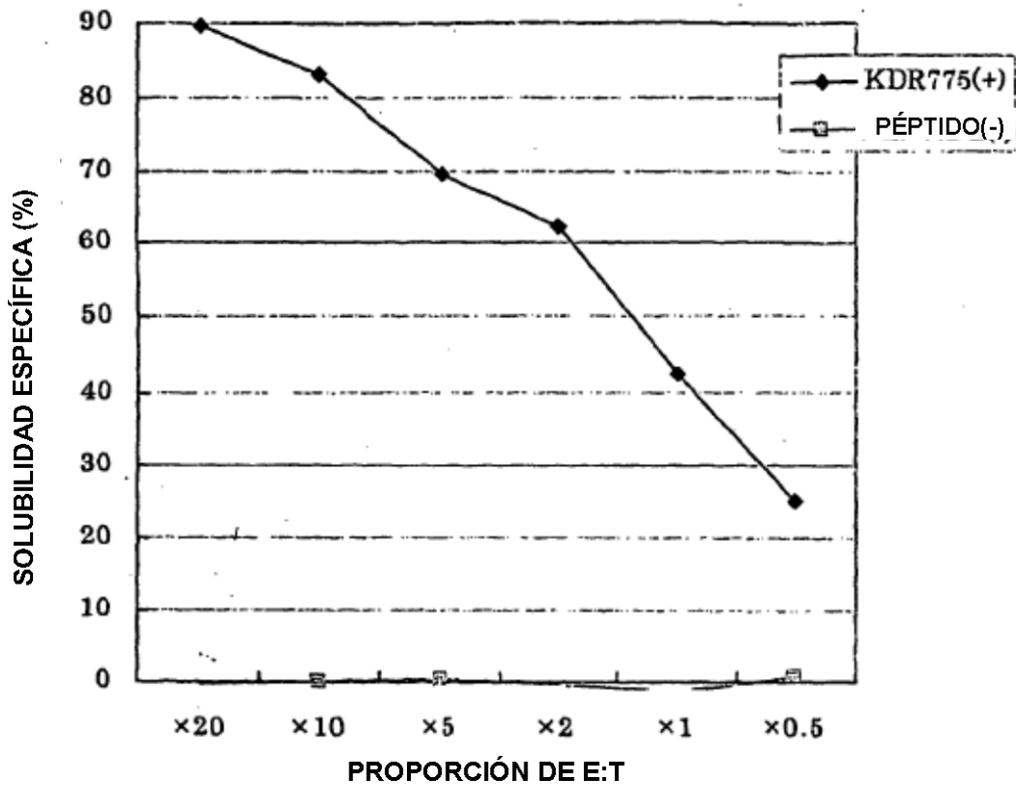


FIG. 9

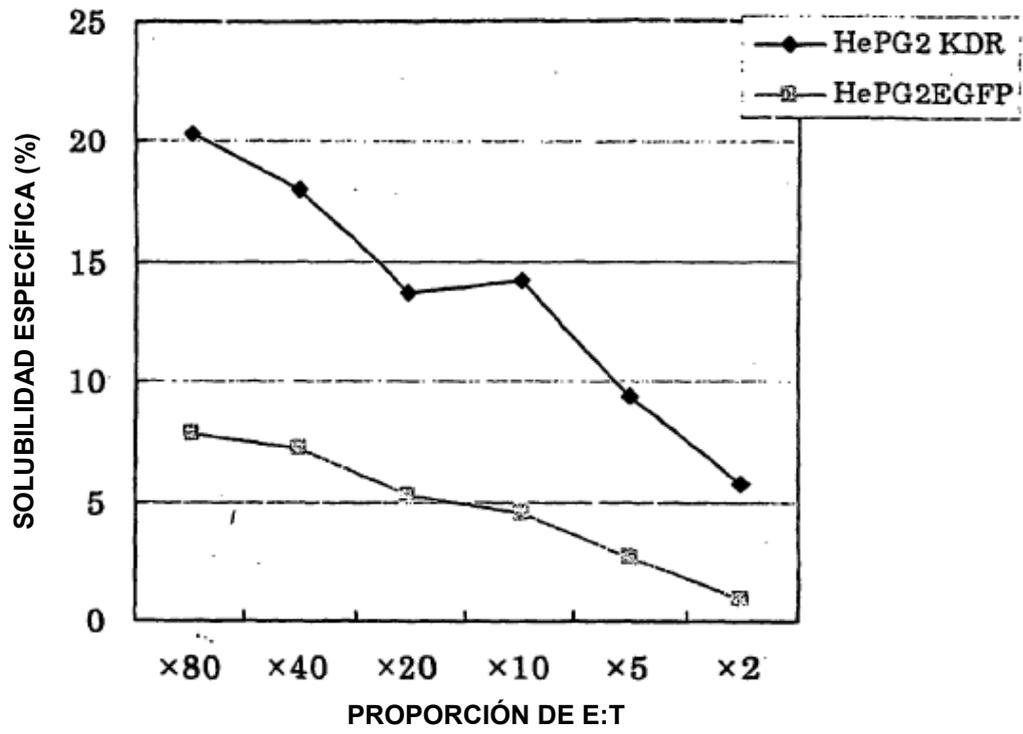


FIG. 10

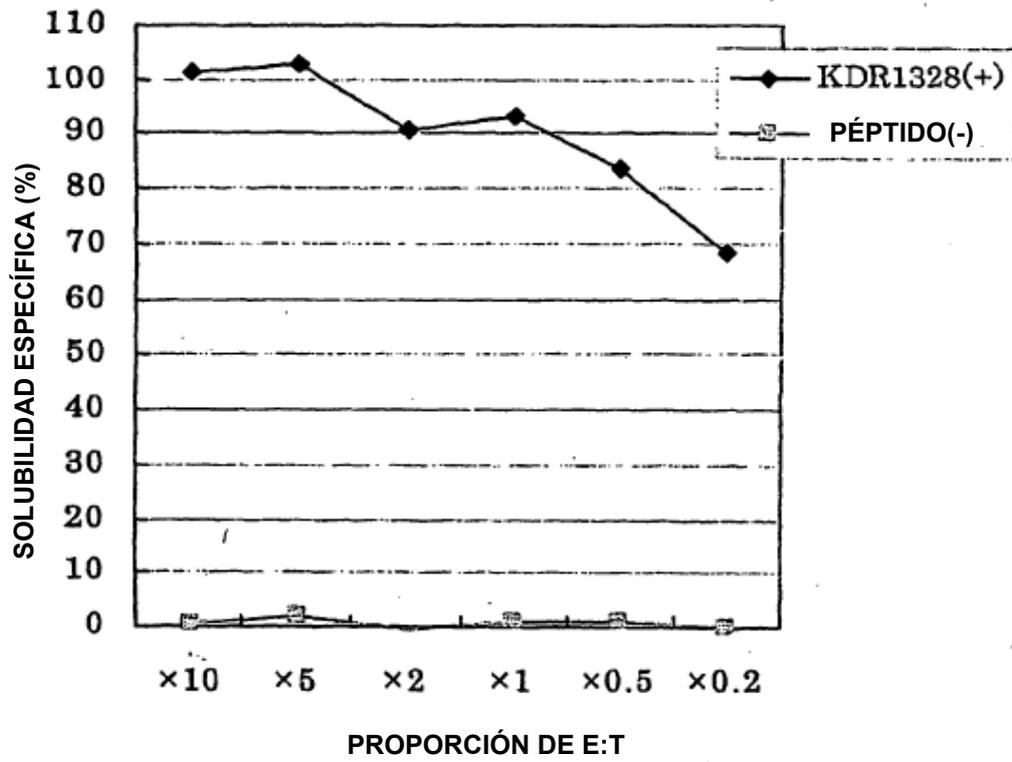


FIG. 11

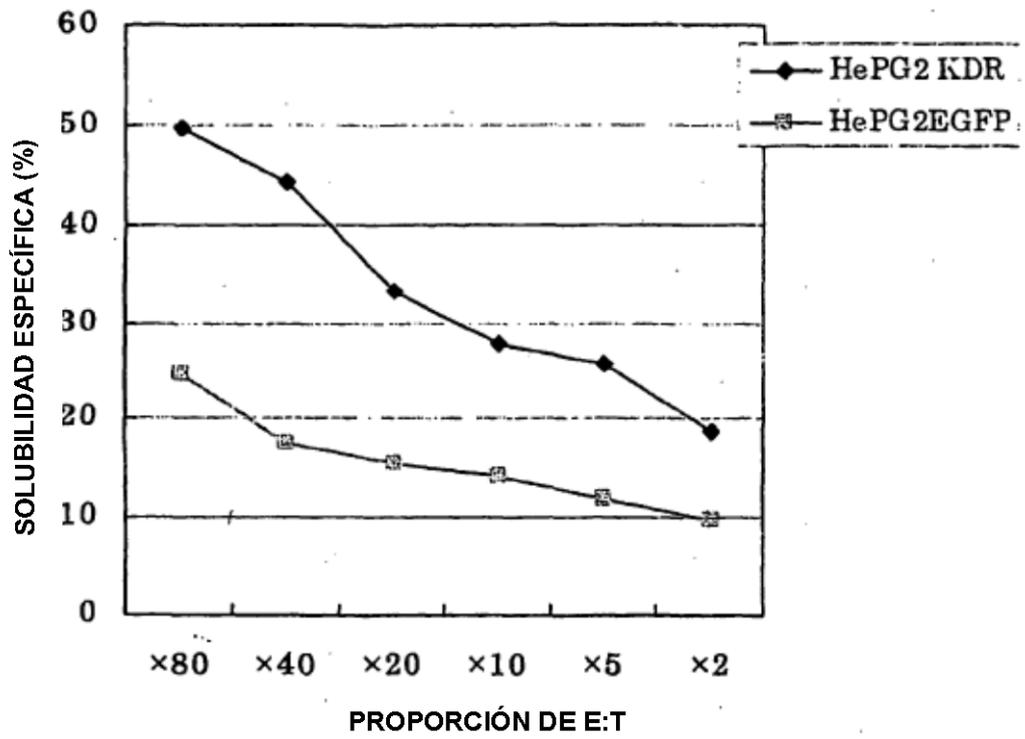


FIG. 12

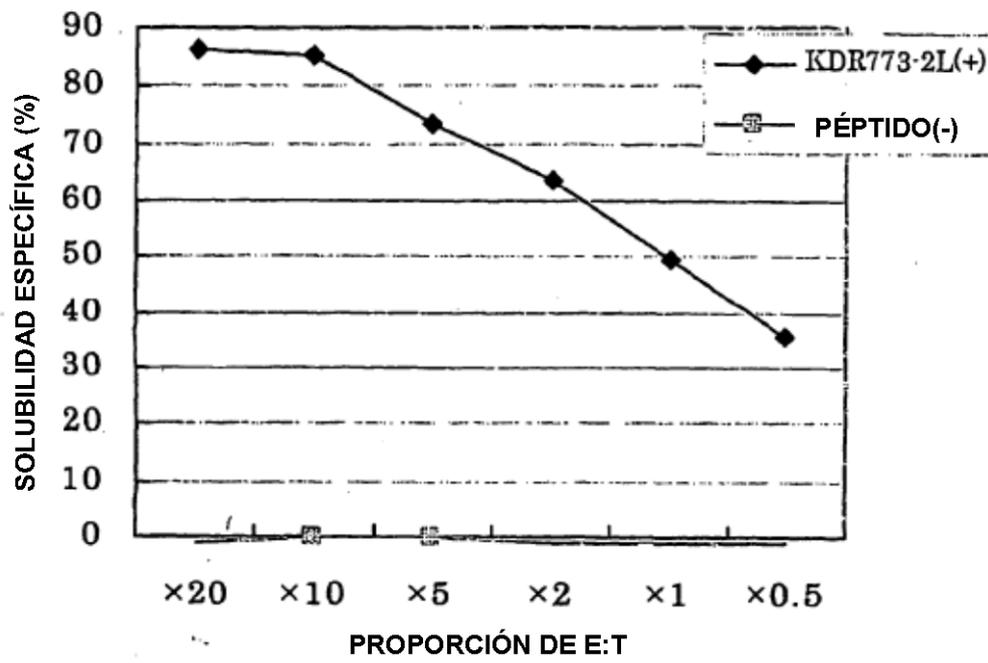


FIG. 13

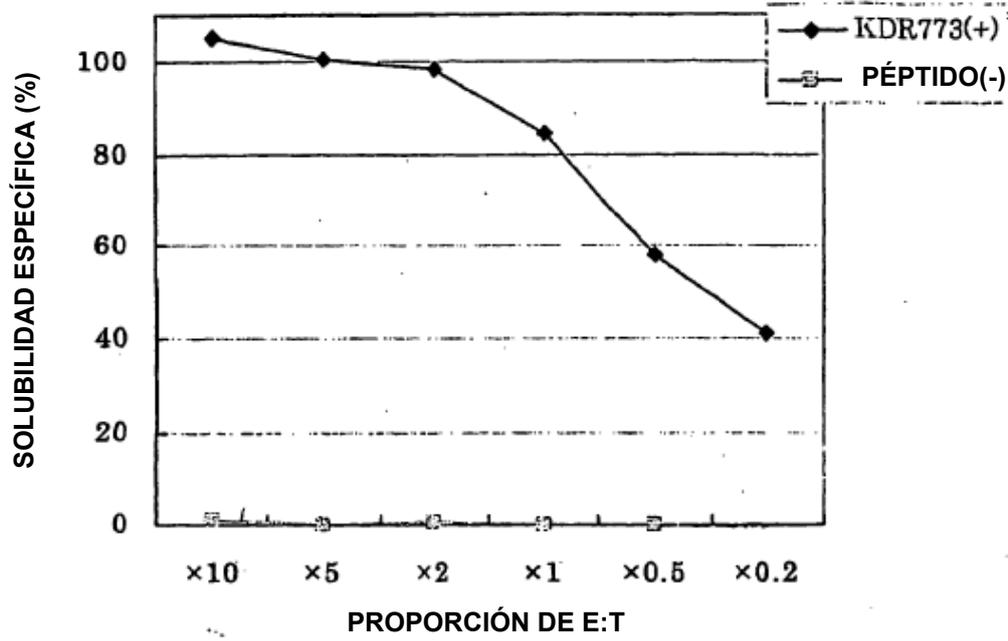


FIG. 14

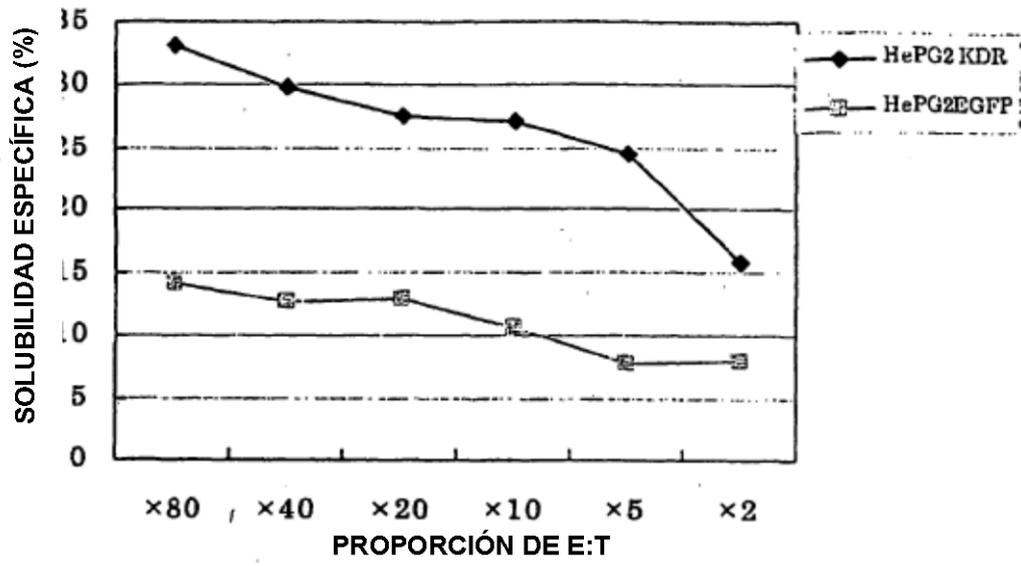


FIG. 15

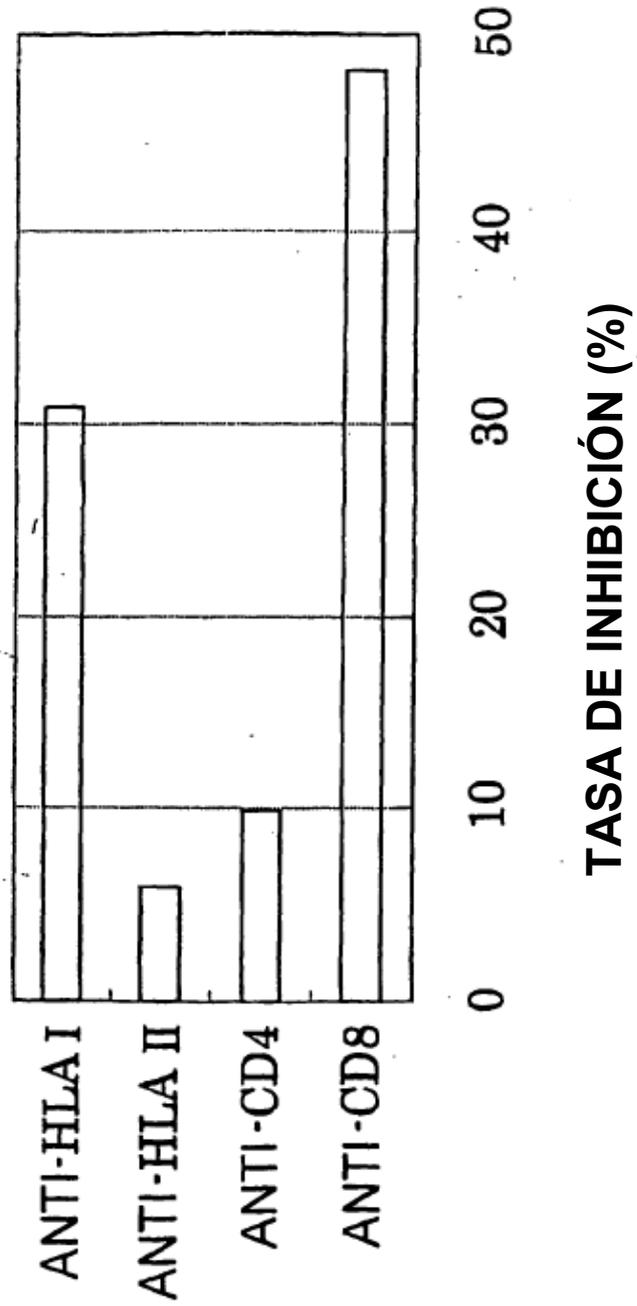


FIG. 16

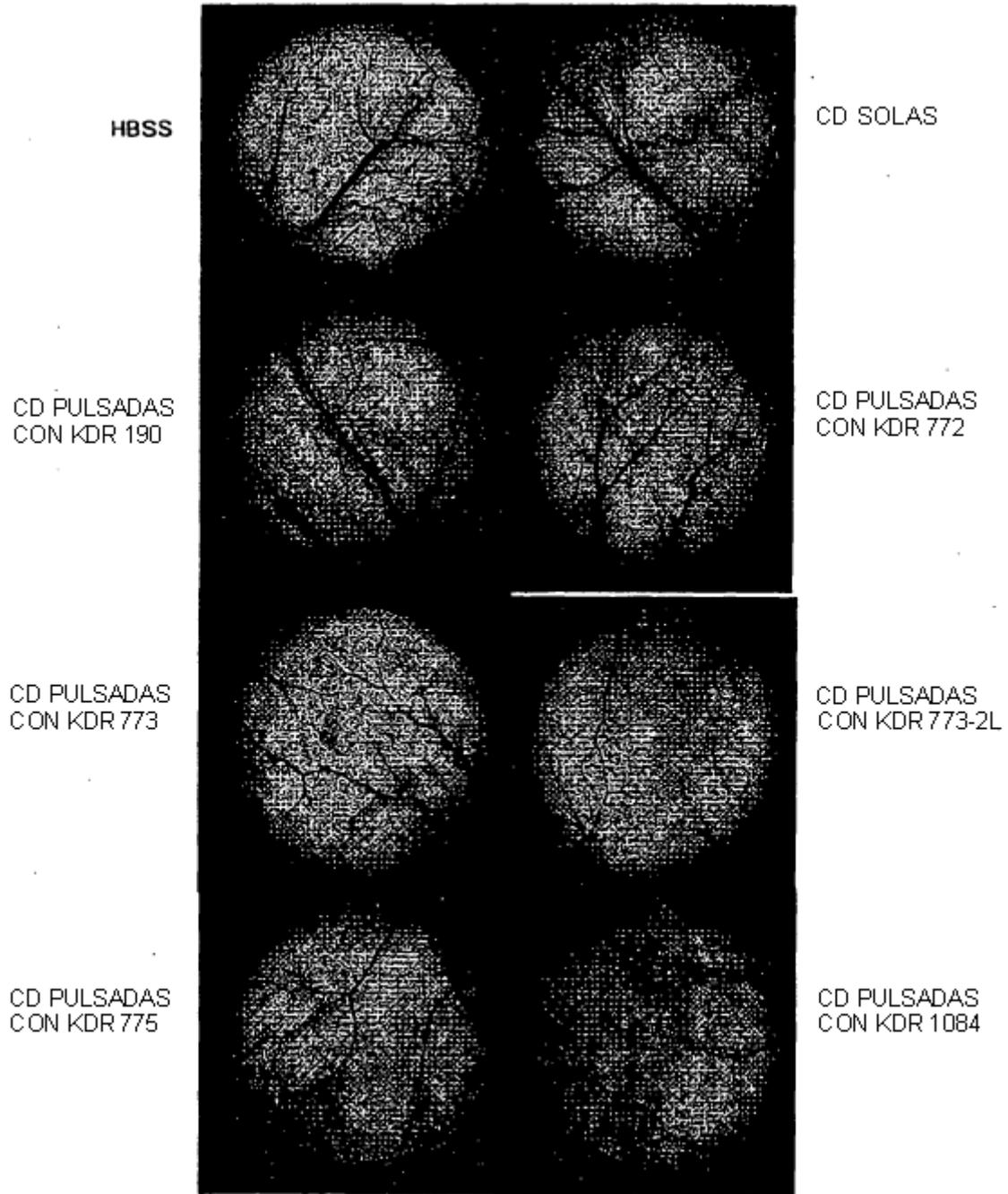


FIG. 17

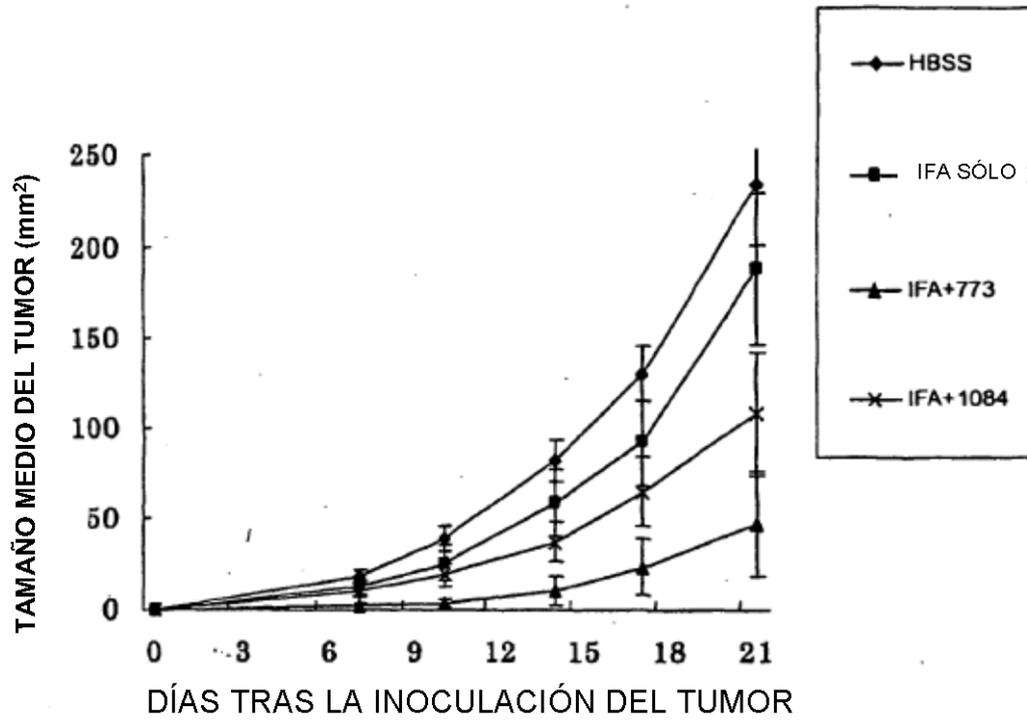


FIG. 18

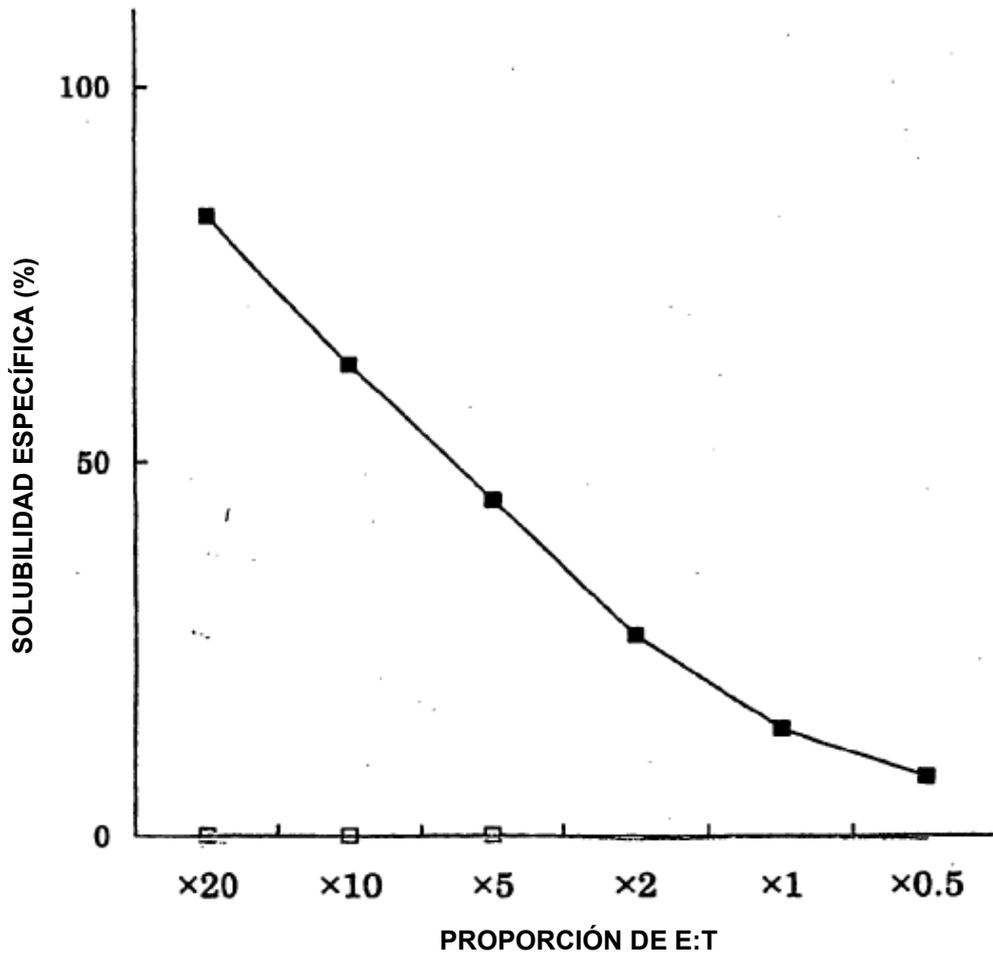


FIG. 19

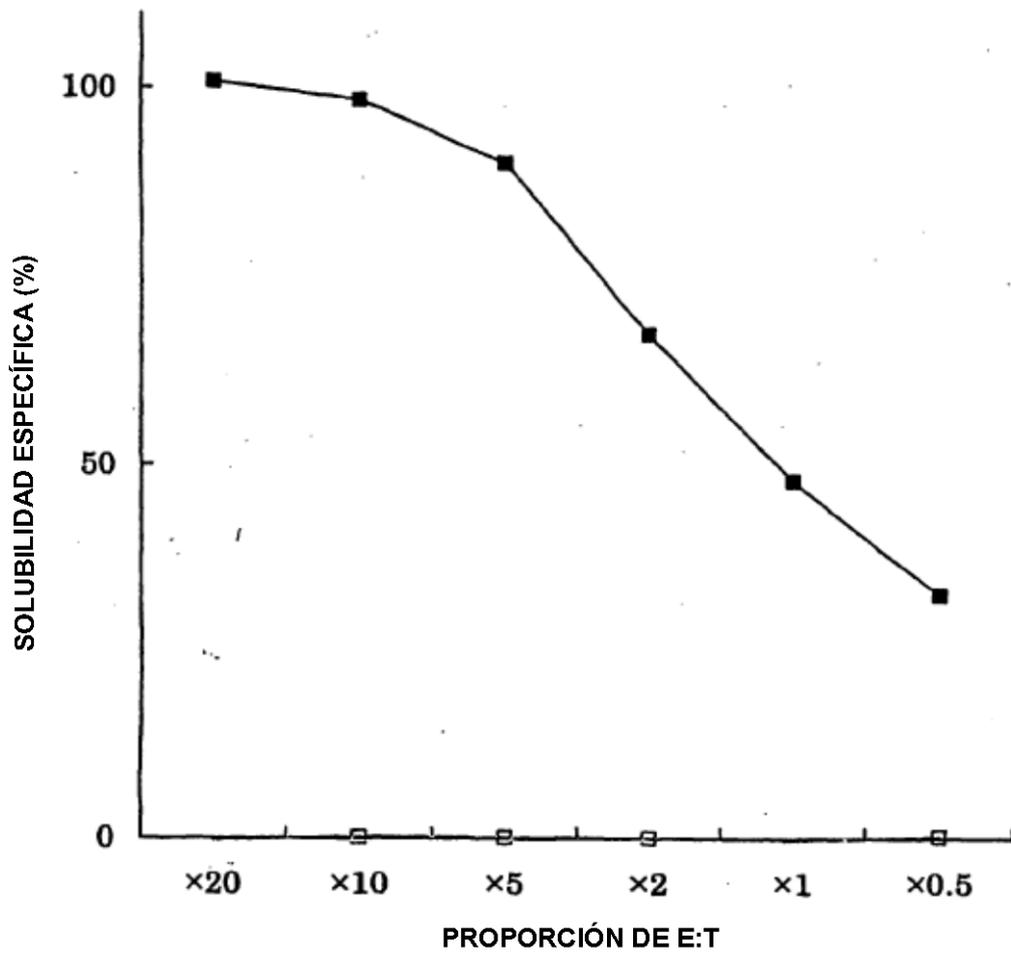


FIG. 20

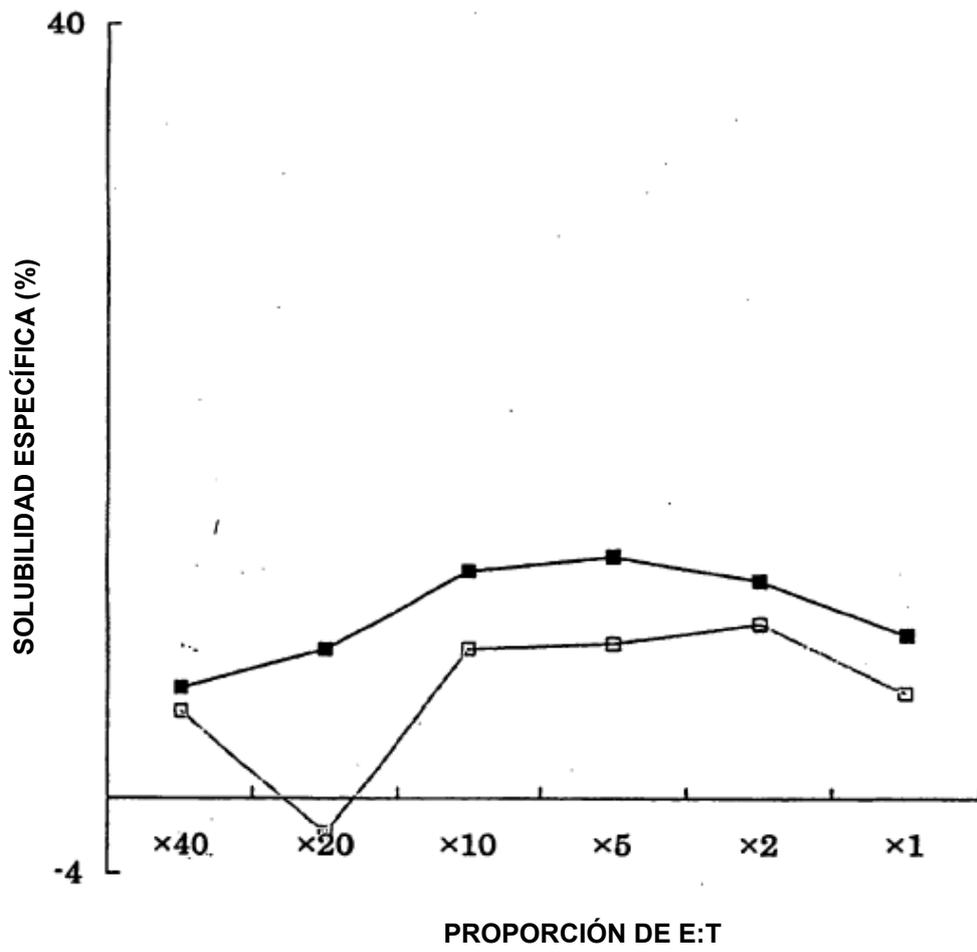


FIG. 21

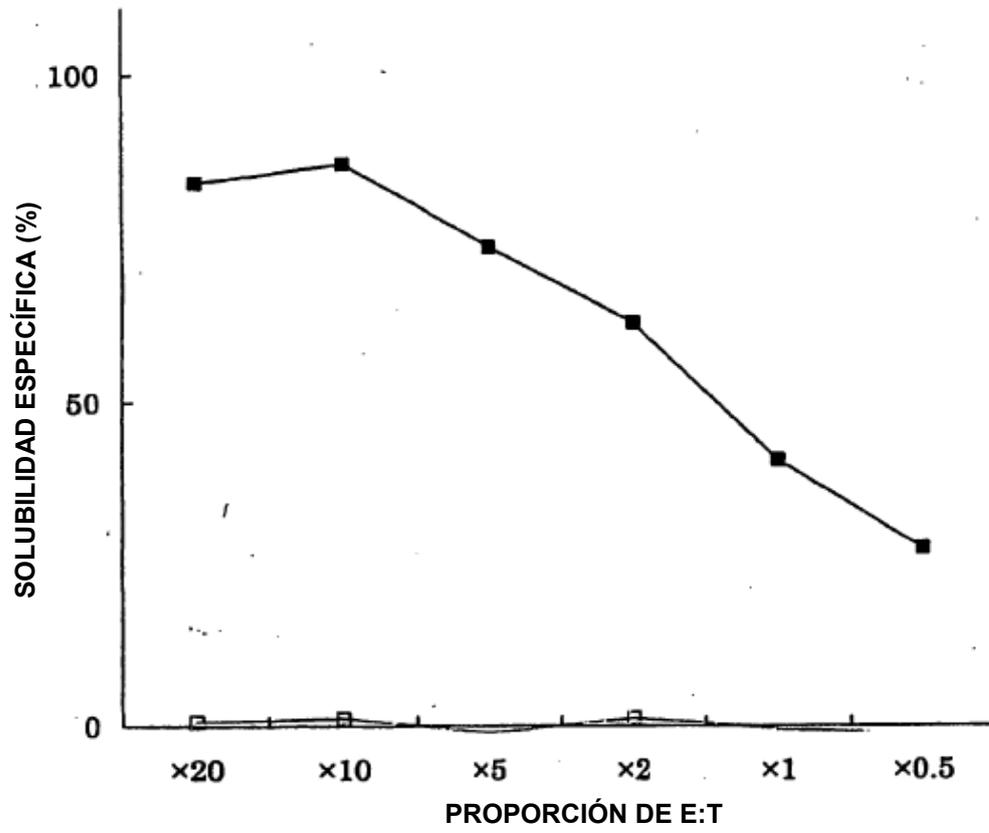


FIG. 22

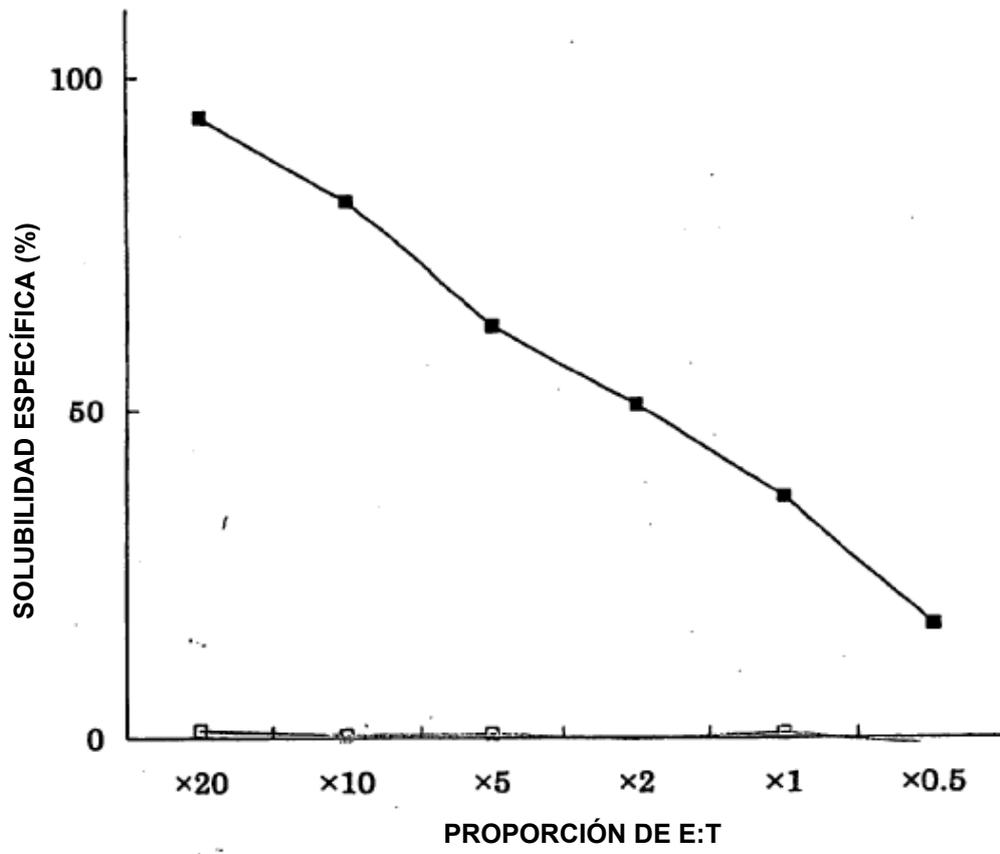


FIG. 23

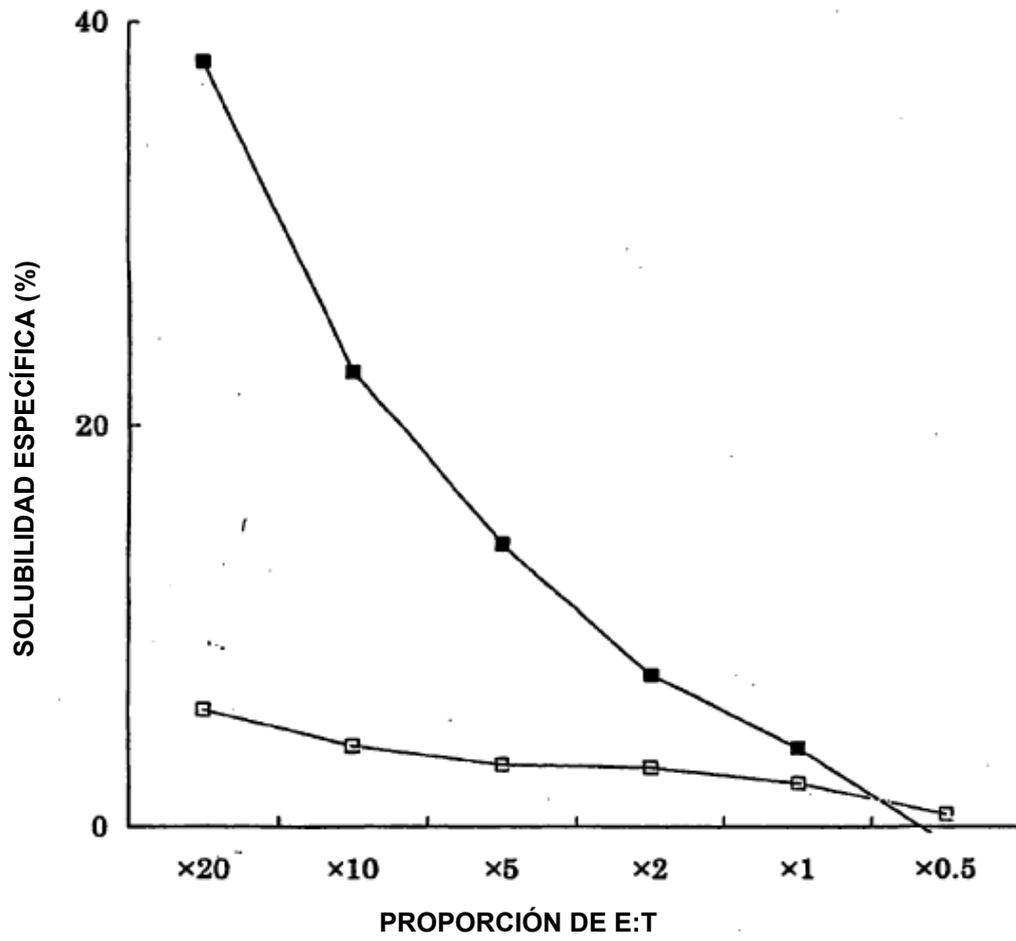


FIG. 24

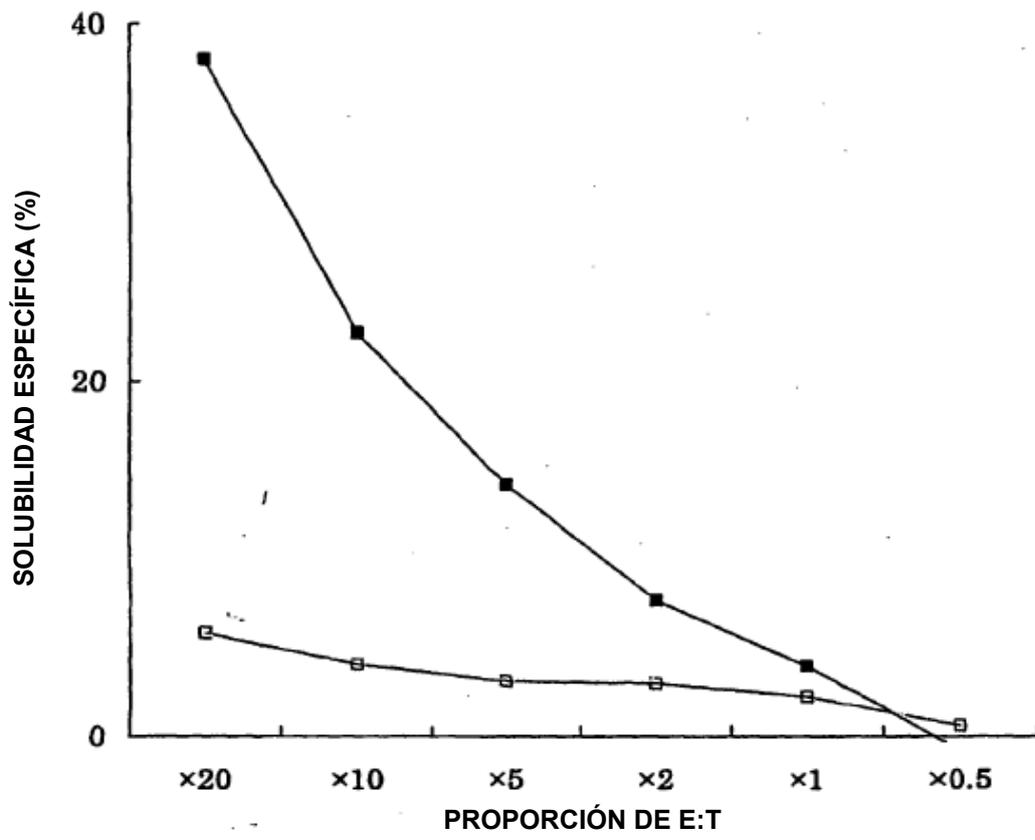


FIG. 25

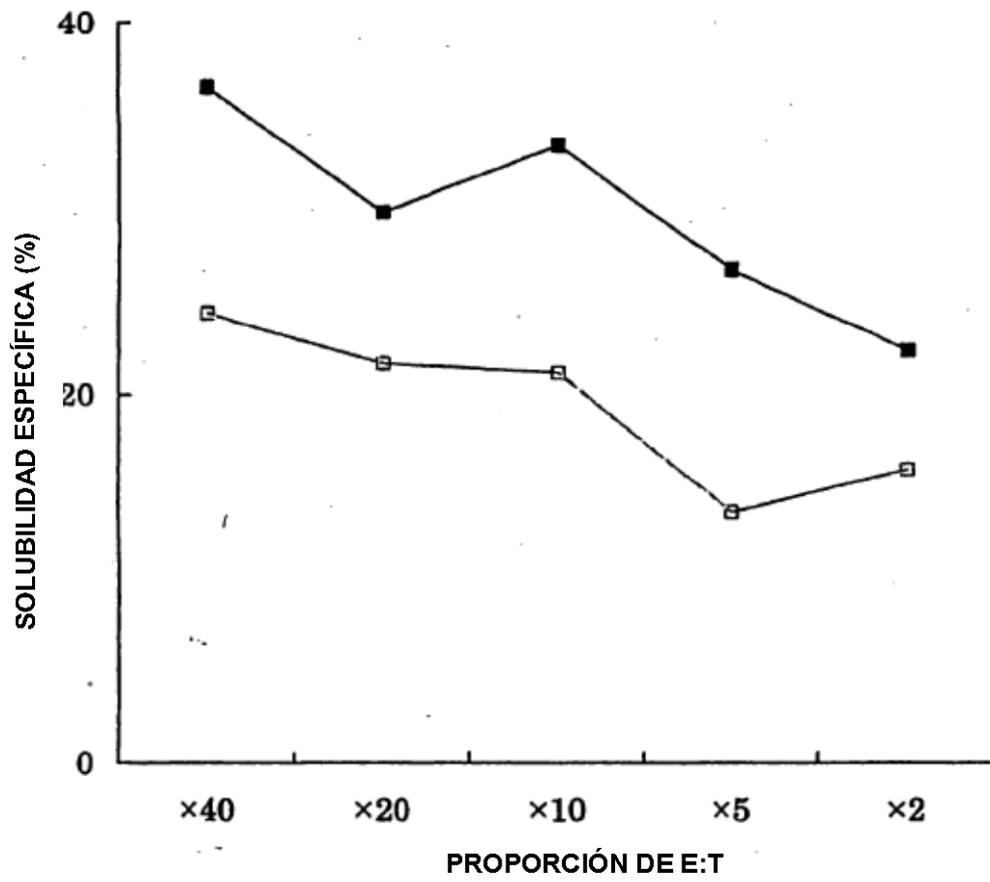


FIG. 26

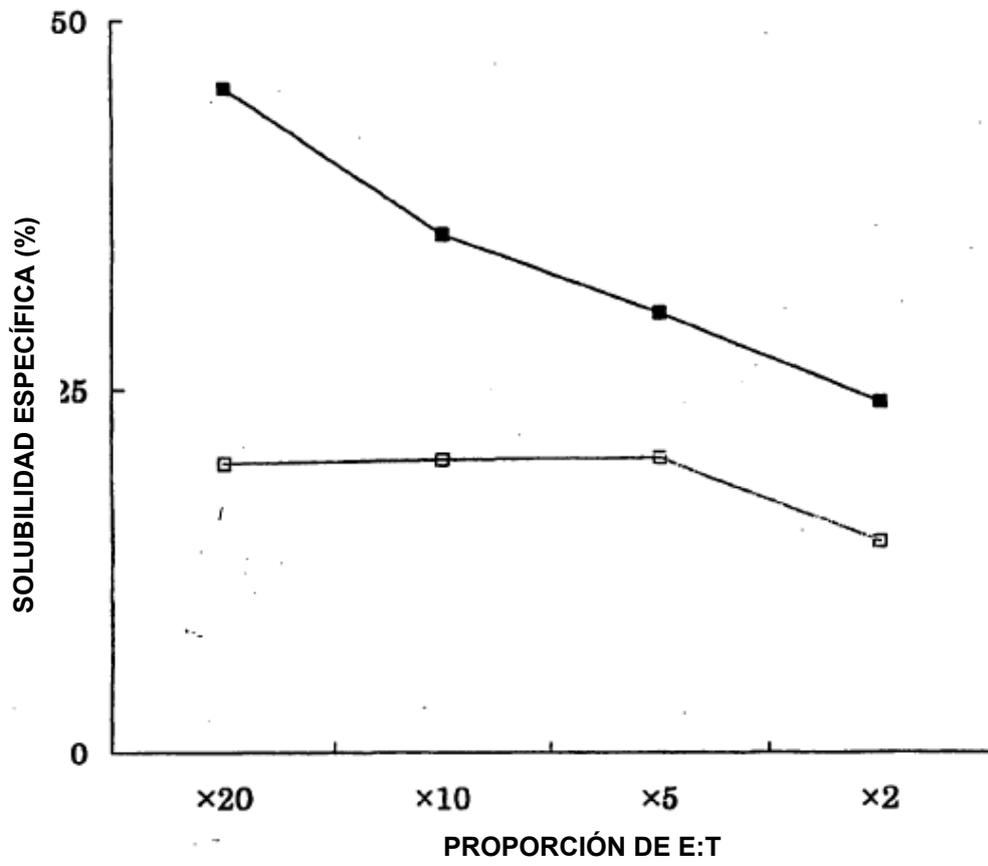


FIG. 27

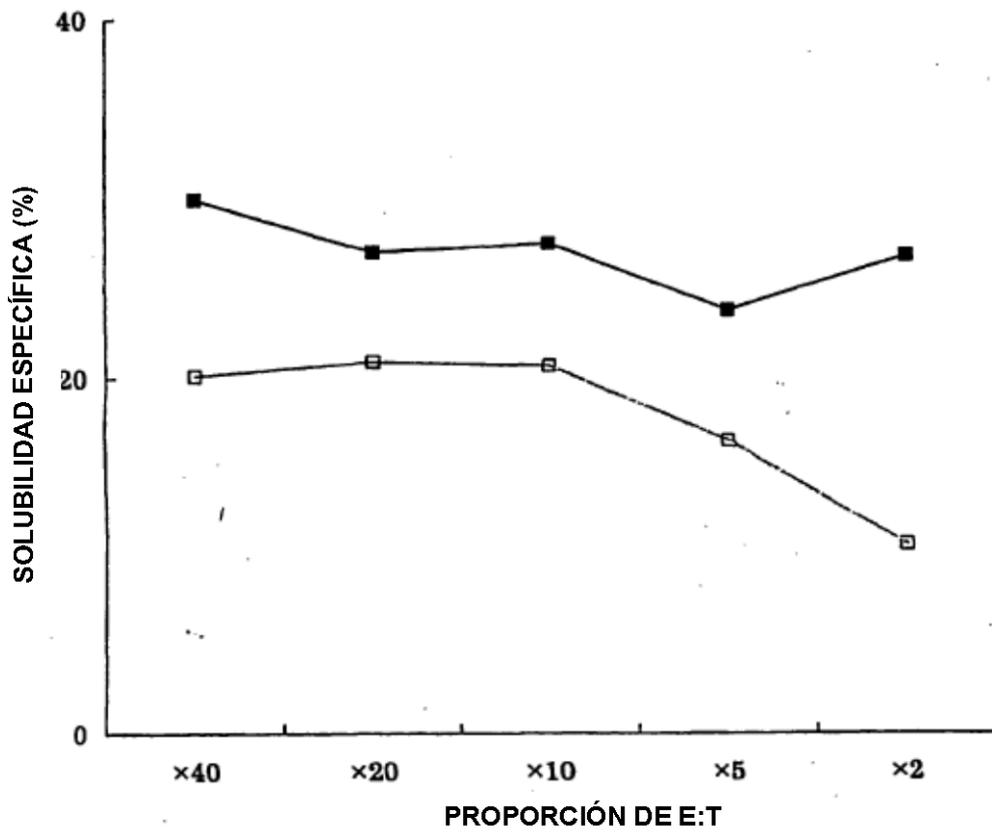


FIG. 28

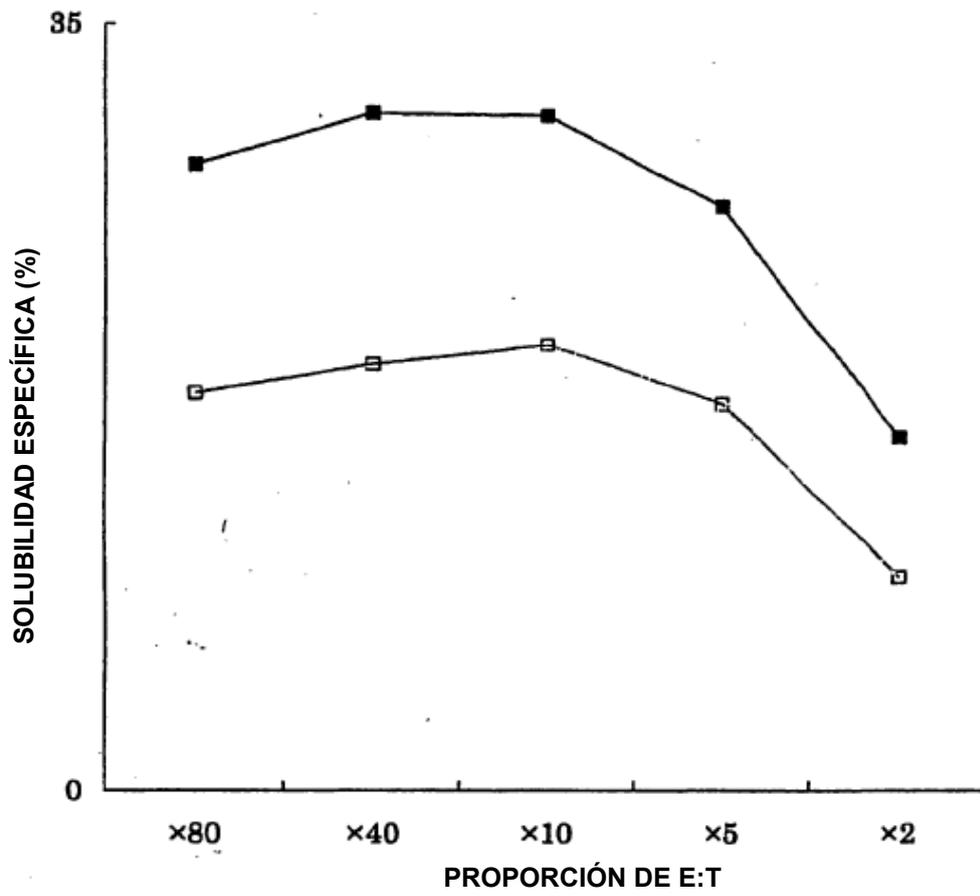


FIG. 29

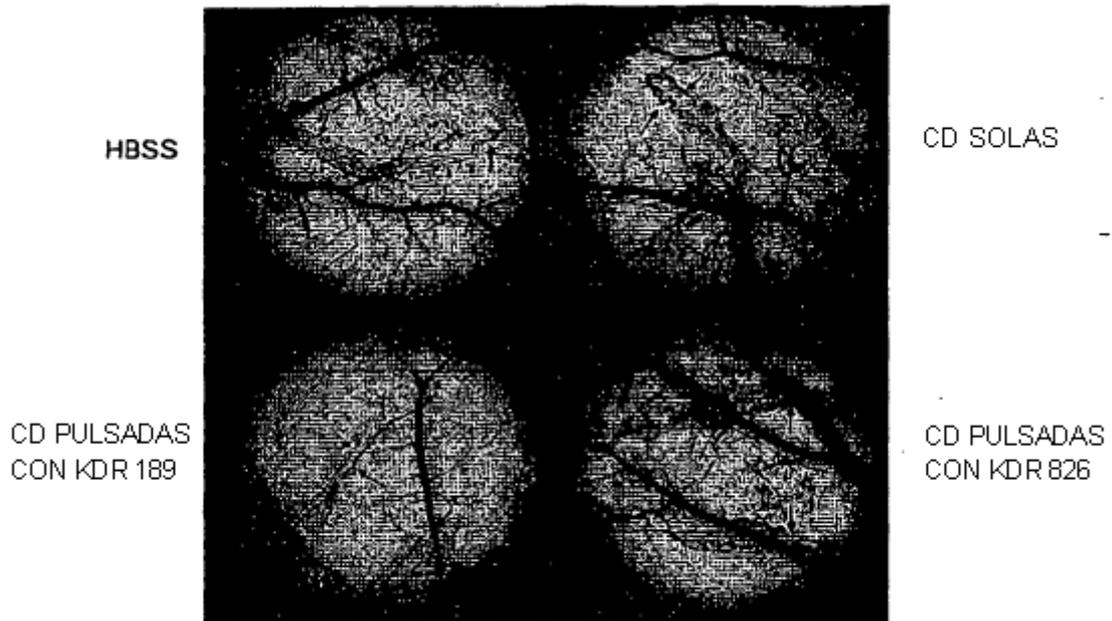


FIG. 30

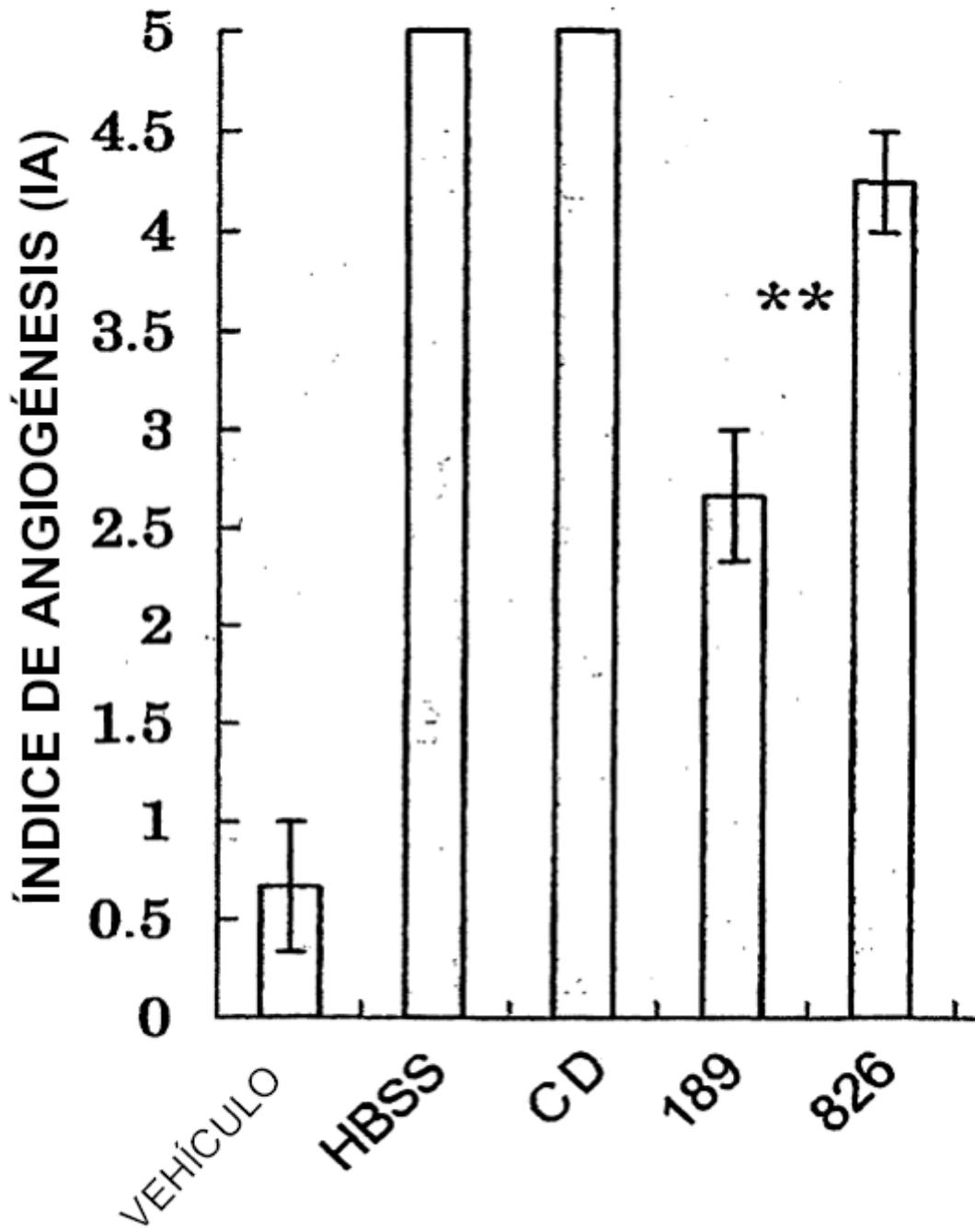


FIG. 31

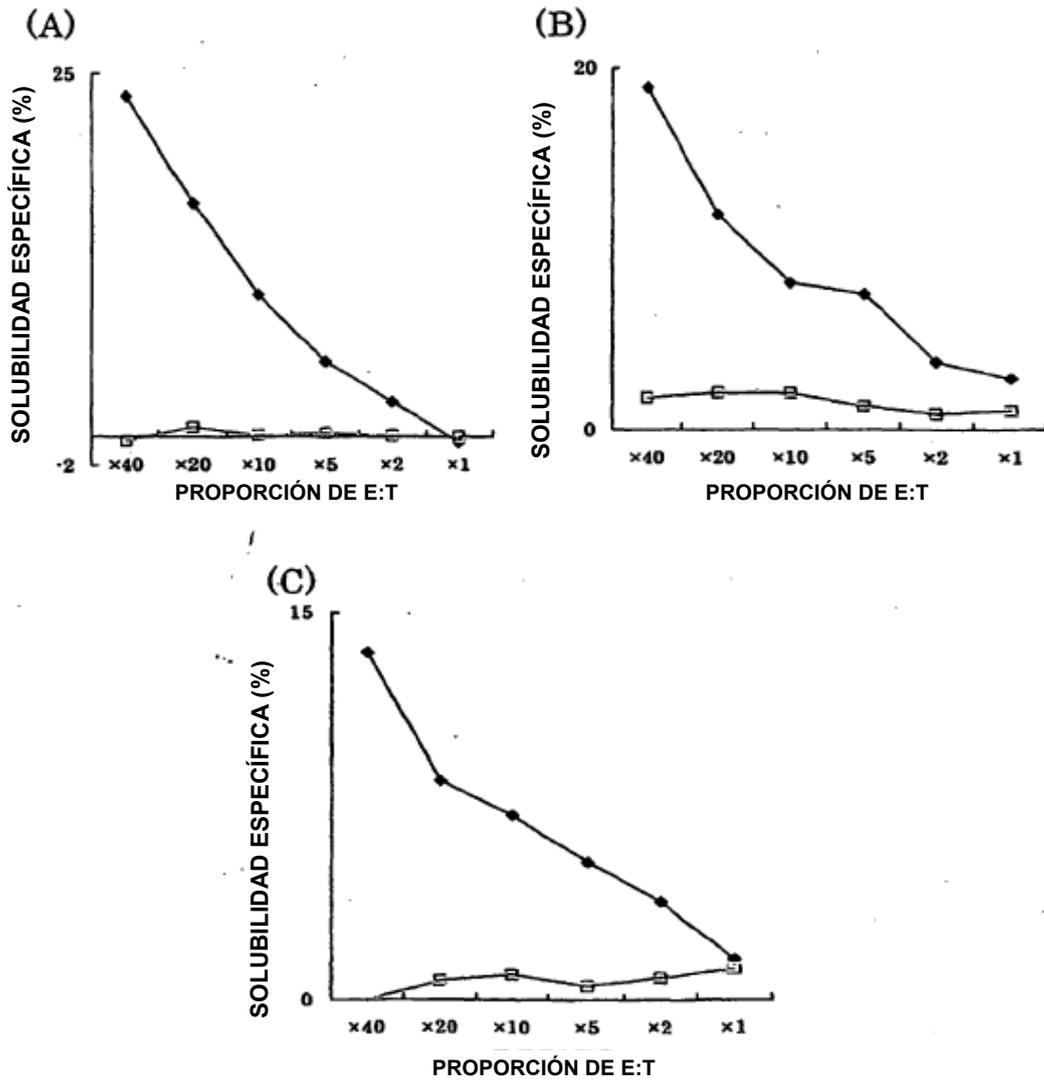


FIG. 32