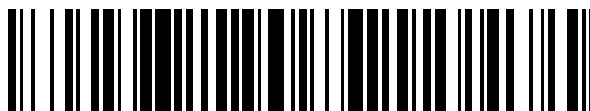


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 396**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06714491 .5**
96 Fecha de presentación: **17.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1855707**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

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

30 Prioridad:
28.02.2005 US 657527 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.07.2012

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

72 Inventor/es:
TAHARA, Hideaki;
TSUNODA, Takuya;
SHIBUYA, Masabumi y
NAKATSURU, Shuichi

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

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).

ES 2 385 396 T3

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

El crecimiento tumoral en general está limitado a 1~2 mm³ en ausencia de un suministro de sangre vascularizada, y la angiogénesis tiene un papel crítico en la invasión, crecimiento y metástasis de tumores (Folkman, J. (2002) Semin. Oncol. 29: 15-8, Folkman, J. (1996) Nat. Med. 2: 167-8, Kerbel y Folkman, (2002). Nature Rev. Cancer. 2: 727-39, Brown *et al.*, (1995) Hum. Pathol. 26: 86-91, Eberhard *et al.*, (2000) Cancer Res. 60: 1388-93). También se ha mostrado que la inhibición de la angiogénesis tumoral se asocia con la supresión de la progresión tumoral. Para alcanzar la supresión de la angiogénesis, un número de investigadores han estado examinando estrategias terapéuticas que se dirigen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y al receptor de VEGF (VEGFR), que desempeñan papeles críticos en la regulación del proceso de angiogénesis. Estos estudios han mostrado que el crecimiento tumoral se puede suprimir con éxito *in vitro* e *in vivo* usando anticuerpos monoclonales, receptores recombinantes o inhibidores para la transducción de señales (El-Mousawi *et al.*, (2003) J.Biol.Chem. 278: 46681-91, Stefanik *et al.*, (2001) J. Neurooncol. 55: 91-100, Wood *et al.*, (2000) Cancer Res. 60: 2178-89, Luttun *et al.*, (2002) Nat. Med. 8: 831-40, Lyden *et al.*, (2001) Nat. Med. 7: 1194-201, Lu *et al.*, (2001) Cancer Res. 61: 7002-8). Sin embargo, estas estrategias requieren la administración frecuente o continua de los reactivos a niveles de dosis relativamente altos, que pueden estar asociados con inconveniencias y efectos secundarios significativos.

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

En el documento US2005/0175624 A1, se han llevado a cabo análisis informáticos para predecir la utilidad de fragmentos de VEGFR1 en inmunoterapia. Sin embargo, no se ha mostrado que ninguno de estos fragmentos induzca una respuesta inmune.

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

Abreviaciones usadas en la presente solicitud:

LTC, linfocito T citotóxico
 VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular
 PlGF, factor de crecimiento de placenta
 VEGFR1, receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular
 VEGFR2, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
 RTG, ratones transgénicos
 AAT, antígeno asociado a tumores
 i.d., inyección intradérmica
 s.c., inyección subcutánea
 IFA, adyuvante de Freund incompleto

Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona péptidos que inducen células T citotóxicas contra células endoteliales que expresan endógenamente VEGFR1.

La presente invención particularmente proporciona:

1. Un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas.
2. Un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos y en donde el péptido no es NLTATLAVNV.
3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis o tumores, en donde la composición comprende uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas; y
 - (b) un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos; o un polinucleótido que codifica dicho péptido.
4. Una vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad mediada por angiogénesis, en donde la vacuna comprende uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas;
 - (b) un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos; y
 - (c) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o un polinucleótido que codifica dicho péptido como principio activo.
5. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis, en donde la composición comprende uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas; y
 - (b) un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos.

Los péptidos descritos en el presente documento comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13 o una secuencia en donde se sustituyen o añaden 1, 2 o varios aminoácidos. En ciertas formas de realización, el segundo aminoácido a partir del extremo N es leucina o metionina. En algunas formas de realización, el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

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

La presente invención proporciona exosomas que presentan en su superficie un complejo que comprende el péptido de esta invención y un antígeno HLA. En algunas formas de realización, el antígeno HLA es HLA-A24 (por ejemplo, HLA A2402) o HLA-A02 (HLA-0201).

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

La presente invención también proporciona vacunas para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis, en donde la vacuna comprende el péptido de la invención como el principio activo. La vacuna de la invención se puede pretender para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A02. En algunas formas de realización, la vacuna se puede usar para suprimir el crecimiento de y/o metástasis de tumores malignos.

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

También se describen en el presente documento métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis en un sujeto que comprenden administrar una vacuna de la invención. En algunas formas de realización, la enfermedad mediada por angiogénesis es retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis o aterosclerosis.

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

Breve descripción de las figuras

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

La figura 2 es un gráfico que muestra el establecimiento de clones de LTC restringidos a HLA-A*2402 usando candidatos de epítomos derivados de VEGFR1. Se usaron células A24-LCL para las respuestas de LTC restringidas a HLA-A*2402 en presencia o ausencia de cada péptido que se une a HLA-A*2402. Los clones de LTC mostraron citotoxicidades específicas contra las células diana pulsadas con los péptidos correspondientes. Relación E/D indica efector/célula diana.

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

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

resultados *in vitro* e *in vivo* sugieren firmemente que VEGFR1 podría ser una diana prometedor, y apoyan la razón fundamental definitiva del desarrollo clínico para inmunoterapia antiangiogénica contra varios tipos de cánceres.

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

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

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

En la presente invención usando nuestros nuevos sistemas modelos *in vitro* e *in vivo*, hemos demostrado que una inmunoterapia que se dirige a la angiogénesis inducida por tumor es eficaz. Al principio, identificamos los péptidos epítomos de VEGFR1 restringidos a HLA-A*0201 y A*2402 que son alelos de HLA reconocidos con frecuencia

(Rammensee *et al.*, 1995. Immunogenetics. 41: 178-228). Los LTC se indujeron con éxito con estos péptidos, y mostraron actividades citotóxicas potentes contra no solo células diana pulsadas con péptidos sino también células que expresan VEGFR1 endógenamente. Nuestros descubrimientos demostraron claramente que el VEGFR1 humano es inmunogénico en el sistema humano.

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

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

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

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

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

LTC en presencia de células presentadoras de antígeno que tienen péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ .

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

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

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

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

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

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

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

Se puede realizar fácilmente la estimulación *in vivo* e *in vitro* de células dendríticas por los péptidos descritos en el presente documento exponiendo las células a una alta concentración de los péptidos de modo que estos péptidos se

intercambian con péptidos que estaban originalmente inmovilizados en las células. Por tanto, los péptidos usados en el presente documento deben tener al menos cierto nivel de afinidad de unión a antígenos HLA.

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

Las composiciones inmunogénicas para el tratamiento y/o prevención de tumores, que comprenden los péptidos descritos en el presente documento como los principios activos, se pueden administrar con un adyuvante de modo que se establezca eficazmente la inmunidad celular, o se pueden administrar con otros principios activos tales como agentes antitumorales, y se pueden administrar mediante formulación en gránulos. Un adyuvante que se puede aplicar incluye los descritos en la bibliografía (Johnson AG. (1994) Clin. Microbiol. Rev., 7:277-89). Los adyuvantes ejemplares incluyen, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre. Además, se pueden usar convenientemente formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las que el fármaco está unido a bolas de unos pocos μm , y formulaciones en las que un lípido se une al fármaco. El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, inyección intravenosa, o similares, y es posible la administración sistémica o la administración local en la vecindad del tumor diana. La dosis de los péptidos descritos en el presente documento se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se va a tratar, la edad del paciente, peso, método de administración, y similares, y es habitualmente de 0,001 mg a 1000 mg, preferiblemente de 0,01 mg a 100 mg, más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg, y preferiblemente se administra una vez en unos pocos días a unos pocos meses. El experto en la materia puede seleccionar de forma apropiada la dosis adecuada.

De forma alternativa, la presente invención proporciona vesículas intracelulares llamadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y antígenos HLA en su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos descritos en detalle en la traducción japonesa publicada de las publicaciones internacionales No. Hei 11-510507 y 2000-512161, y preferiblemente se preparan usando células presentadoras de antígenos obtenidas de sujetos que son dianas de tratamiento y/o prevención. Los exosomas de esta invención se pueden inocular como vacunas contra el cáncer, de forma similar a los péptidos de esta invención.

El tipo de antígenos HLA usado debe coincidir con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, para un japonés HLA-A24 o HLA-A02, particularmente HLA-A2402 o HLA-A0201 pueden ser apropiados.

En algunas formas de realización, las composiciones vacunas descritas en el presente documento pueden comprender un componente que sensibiliza linfocitos T citotóxicos. Se han identificado lípidos como agentes capaces de sensibilizar LTC *in vivo* contra agentes víricos. Por ejemplo, se pueden unir residuos de ácido palmítico a los grupos ϵ - y α -amino de un residuo de lisina y después unirse a un péptido inmunogénico de la invención. El péptido lipidado se puede administrar después directamente en una micela o partícula, incorporado en un liposoma, o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de sensibilización lipídica de respuestas de LTC, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P3CSS), para sensibilizar LTC cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres, *et al.*, (1989) Nature 342:561-4).

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento también pueden comprender ácidos nucleicos que codifican los péptidos inmunogénicos divulgados aquí. Véase, por ejemplo, Wolff *et al.*, (1990) Science 247:1465-8; las patentes en EE UU Nos. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y el documento WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de administración basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por péptidos), complejos lipídicos catiónicos y administración mediada por partículas ("bombardeo de genes") o mediada por presión (véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 5.922.687).

Los péptidos inmunogénicos descritos en el presente documento también se pueden expresar mediante vectores víricos o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen huéspedes víricos atenuados, tales como vaccinia o viruela aviar. Este planteamiento implica el uso del virus vaccinia, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Tras la introducción en un huésped, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido inmunogénico y de esta manera provoca una respuesta inmune. Se describen vectores vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización en, por ejemplo, la patente en EE UU No. 4.722.848. Otro vector es BCG (Bacilo Calmette Guérin). Los vectores BCG se describen en Stover, *et al.*, (1991) Nature 351:456-60. Serán aparentes una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o inmunización, por ejemplo, vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores Salmonella typhi o vectores de la toxina del carbunco detoxificada. Véase, por ejemplo, Shata, *et al.*, (2000) Mol. Med. Today 6:66-71; Shedlock, *et al.*, (2000) J. Leukoc. Biol. 68:793-806; y Hipp, *et al.*, (2000) In vivo 14:571-85.

También se describen en el presente documento métodos de inducir células presentadoras de antígeno usando los péptidos descritos en el presente documento. Las células presentadoras de antígeno se pueden inducir mediante inducción de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica y después poniéndolas en contacto (estimándolas) con los péptidos descritos en el presente documento *in vitro* o *in vivo*. Cuando los péptidos descritos en el presente documento se administran a los sujetos, se inducen en el cuerpo del sujeto células presentadoras de antígeno que tienen los péptidos descritos en el presente documento inmovilizados en ellas. De forma alternativa, después de inmovilizar los péptidos descritos en el presente documento a las células presentadoras de antígeno, las células se pueden administrar al sujeto como una vacuna.

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

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

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

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

En la presente invención, la frase "vacuna" (también denominada una composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad contra células endoteliales tumorales para suprimir tumores tras la inoculación en animales.

Como se describen en el presente documento se sugirió que los polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13 eran péptidos epítopos restringidos a HLA-A02 y se sugirió que SEQ ID NO: 32 era un péptido epítopo restringido a HLA-A24 que pueden inducir una respuesta inmune potente y específica contra células endoteliales tumorales que expresan VEGFR1. Por tanto, la presente invención también abarca un método de inducción de inmunidad antitumoral usando polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 13, 32. En general, la inmunidad antitumoral incluye respuestas inmunes tales como las siguientes:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La inmunidad antitumoral se induce administrando la vacuna descrita en el presente documento y la inducción de inmunidad antitumoral permite el tratamiento y prevención de tumores. La terapia contra o la prevención del inicio de tumores incluye cualquiera de los pasos, tales como inhibición del crecimiento de células tumorales, involución de células tumorales y supresión de la aparición de células tumorales. El descenso en la mortalidad de individuos que tienen tumores, el descenso de marcadores tumorales en la sangre, el alivio de los síntomas detectables que

acompañan a los tumores y similares también se incluyen en la terapia o prevención de tumores. Tales efectos terapéuticos y preventivos preferiblemente son estadísticamente significativos. Por ejemplo, en observación, a un nivel de significancia del 5% o menos, en donde el efecto terapéutico o preventivo de una vacuna contra tumores se compara a un control sin la administración de la vacuna. Por ejemplo, se pueden usar la prueba de la *t* de Student, la prueba U de Mann-Whitney o ANOVA para los análisis estadísticos.

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

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

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar al experto en la materia a hacer y usar la misma. No se pretende de ninguna manera que los ejemplos limiten de otra manera el ámbito de la invención.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación.

Ejemplos

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

Materiales y Métodos

Líneas celulares

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

Péptidos sintéticos

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

El péptido CEA (DVLYGPDTP (SEQ ID NO: 41)) se usó como control positivo para un modelo de ratón *in vivo*. Los péptidos de CMV (A02; NLVPMVATV (SEQ ID NO: 42), A24; QYDPVAALF (SEQ ID NO: 43)) se usaron como

controles positivos para la inducción de LTC humanos *in vitro* (Solache *et al.*, (1999) J. Immunol. 163: 5512-8, Kuzushima *et al.*, (2001) Blood. 98: 1872-81).

Animales

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

Generación de líneas y clones de LTC

Se usaron células dendríticas (CD) derivadas de monocitos para inducir respuestas de LTC contra péptidos presentados en HLA como se ha descrito previamente (Nukaya *et al.*, (1999) Int. J. Cancer. 80: 92-7, Tsai *et al.*, (1997) J. Immunol. 158: 1796-802, Nakahara *et al.*, (2003) Cancer Res. 63: 4112-8). Brevemente, se obtuvieron PBMC de voluntarios sanos con HLA correspondientes y se cultivaron en presencia de GM-CSF (suministrado por Kirin Brewery Company, Japón) e IL-4 (Genzyme/Techne, Minneapolis). Después de cultivar durante 5 días, se añadió al cultivo OK-432 (Chugai Pharmaceutical Corporation, Japón) para obtener CD maduras (Nakahara *et al.*, (2003) Cancer Res. 63: 4112-8). El día 7, las CD maduras generadas se pulsaron con cada péptido para la estimulación de células T. Usando estas CD pulsadas con péptidos cada vez, se estimularon las células T CD8+ autólogas durante tres veces los días 0, 7 y 14, y después se probaron las actividades citotóxicas de las células linfoides resultantes el día 21.

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

Ensayo de citotoxicidad

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

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

Inmunogenicidad de péptidos epítomos en RTG A2/Kb

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

Ensayo de angiogénesis *in vivo*

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

Efectos antitumorales *in vivo*

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

Análisis estadístico

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

ResultadosPéptidos que se predice se unen a HLA de clase I de la proteína VEGFR1

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

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

Establecimiento de clones de LTC usando candidatos epítomos derivados de VEGFR1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Examinamos si la vacunación usando péptidos derivados de VEGFR1 suprimía la angiogénesis inducida por tumor. Para confirmar los efectos de la vacunación con péptidos sobre la angiogénesis inducida por las células tumorales, empleamos un ensayo de saco aéreo dorsal (ensayo DAS) que visualiza el grado de neovascularización *in vivo*. En este ensayo semicuantitativo, se observó una inhibición significativa de la angiogénesis en los ratones vacunados con los péptidos VEGFR1-1087, -770, -417 (figura 5).

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

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

Discusión

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

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

5 Aplicabilidad industrial

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

Lista de secuencias

<110> LA UNIVERSIDAD DE TOKIO
ONCOTERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS EPÍTOPOS DERIVADOS DEL RECEPTOR 1 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y VACUNAS QUE CONTIENEN ESTOS PÉPTIDOS

<130> ONC-A0415P

<150> US 60/657.527

<151> 28-02-2005

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 1

Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 3

Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val

1 5

5 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 10 <400> 4
 Cys Val Ala Ala Thr Leu Phe Trp Leu
 1 5

 15 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 20 <400> 5
 Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu
 1 5

 25 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 6
 Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala
 1 5

 35 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 7
 Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu Thr
 1 5

 45 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 8
 Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu
 1 5

 55

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 9
 Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val
 1 5
 10
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 20 <400> 10
 Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 30 <400> 11
 Lys Leu Gly Asp Leu Leu Gln Ala Asn Val
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 12
 Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile
 1 5 10
 45 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 13
 Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val
 1 5 10
 55 <210> 14

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

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

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18
Phe Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 19
 Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile
 1 5 10

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

 15 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 20
 Ile Leu Leu Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr
 1 5 10

 20 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 21
 Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu
 1 5

 30 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 22
 Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu
 1 5

 45 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

 55 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

<210> 25
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 25
 Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 1 5

<210> 26
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

30 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

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

40 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 28
 Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu
 1 5

50 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 29
 Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu
 1 5

5 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 30
 Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe
 1 5

15 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 31
 Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe
 1 5 10

30 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 32
 Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
 1 5 10

40 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 33
 Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly Met
 1 5 10

50 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 34
 Lys Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu
 1 5 10

5 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 35
 Ser Phe Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe
 1 5 10

15 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 36
 Arg Tyr Val Asn Ala Phe Lys Phe Met Ser
 1 5 10

25 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 37
 Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile Leu
 1 5 10

35 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

45 <400> 38
 Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys Ile Leu
 1 5 10

50 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 39

Glu Leu Val Glu Lys Leu Gly Asp Leu Leu
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 10 <400> 40
 Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Leu
 1 5 10
 <210> 41
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 41
 Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Ile
 1 5 10
 25 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 42
 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
 1 5
 35 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 43
 Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
 45 1 5
 <210> 44
 <211> 5777
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 44

ES 2 385 396 T3

gcggacactc ctctcggctc ctccccggca gcggcggcgg ctoggagcgg gctccggggc	60
tcgggtgcag cggccagcgg gcctggcggc gaggattacc cggggaagtg gttgtctcct	120
ggctggagcc gcgagacggg cgctcagggc gcggggccgg cggcggcgaa cgagaggacg	180
gactctggcg gccgggtcgt tggccggggg agcgcgggca ccgggcgagc aggcccgctc	240
gcgctcacca tggtcagcta ctgggacacc ggggtcctgc tgtgcgcgt gctcagctgt	300
ctgcttctca caggatctag ttcaggttca aaattaaaag atcctgaact gagtttaaaa	360
ggcaccacagc acatcatgca agcaggccag aactgcac tccaatgcag gggggaagca	420
gcccataaat ggtctttgcc tgaaatggtg agtaaggaaa gcgaaaggct gagcataact	480
aaatctgcct gtggaagaaa tggcaaaca ttctgcagta ctttaacctt gaacacagct	540
caagcaaacc aactggctt ctacagctgc aaatatctag ctgtacctac ttcaaagaag	600
aaggaaacag aatctgcaat ctatatattt attagtata caggtagacc tttcgtagag	660
atgtacagtg aaatccccga aattatacac atgactgaag gaaggagct cgtcattccc	720
tgccggggtta cgtcacctaa catcactgtt actttaaaaa agtttccact tgacactttg	780
atccctgatg gaaaacgcat aatctgggac agtagaaagg gttcatcat atcaaatgca	840
acgtacaaaag aaatagggtt tctgacctgt gaagcaacag tcaatgggca tttgtataag	900
acaaactatc tcacacatcg acaaaccaat acaatcatag atgtccaaat aagcacacca	960
cggccagtca aattacttag aggcataact cttgtcctca attgtactgc taccactccc	1020

ES 2 385 396 T3

ttgaacacga gagttcaaat gacctggagt taccctgatg aaaaaataa gagagcttcc	1080
gtaaggcgac gaattgacca aagcaattcc catgccaaca tattctacag tgttcttact	1140
attgacaaaa tgcagaacaa agacaaagga ctttatactt gtcgtgtaag gagtggacca	1200
tcattcaaat ctgttaacac ctcagtgcatt atatatgata aagcattcat cactgtgaaa	1260
catcgaaaac agcaggtgct tgaaaccgta gctggcaagc ggtcttaccg gctctctatg	1320
aaagtgaagg catttccctc gccggaagtt gtatgggtta aagatgggtt acctgcgact	1380
gagaaatctg ctcgctatct gactcgtggc tactcgttaa ttatcaagga cgtaactgaa	1440
gaggatgcag ggaattatac aatcttgctg agcataaaac agtcaaattgt gtttaaaaac	1500
ctcactgcca ctctaattgt caatgtgaaa cccagattt acgaaaaggc cgtgtcatcg	1560
tttccagacc cggtctctta cccactgggc agcagacaaa tcttgacttg taccgcatat	1620
ggtatccctc aacctacaat caagtgggtc tggcaccct gtaaccataa tcattccgaa	1680
gcaaggtgtg acttttggtc caataatgaa gagtccctta tcttgatgc tgacagcaac	1740
atgggaaaca gaattgagag catcactcag cgcatggcaa taatagaagg aaagaataag	1800
atggctagca ccttggttgt ggtgactct agaatttctg gaatctacat ttgcatagct	1860
tccaataaag ttgggactgt gggaagaaac ataagctttt atatcacaga tgtgccaaat	1920
gggtttcatg ttaacttgga aaaaatgccg acggaaggag aggacctgaa actgtcttgc	1980
acagttaaca agttcttata cagagacgtt acttgattt tactgcggac agttaataac	2040
agaacaatgc actacagtat tagcaagcaa aaaatggcca tctaagga gcactccatc	2100
actcttaatc ttaccatcat gaatgtttcc ctgcaagatt caggcaccta tgctgcaga	2160
gccaggaatg tatacacagg ggaagaaatc ctccagaaga aagaaattac aatcagagat	2220

ES 2 385 396 T3

caggaagcac catacctcct gcgaaacctc agtgatcaca cagtggccat cagcagttcc 2280
 accacttttag actgtcatgc taatgggtgtc cccgagcctc agatcacttg gtttaaaaaac 2340
 aaccacaaaa tacaacaaga gcctggaatt attttaggac caggaagcag cacgctgttt 2400
 attgaaagag tcacagaaga ggatgaaggt gtctatcact gcaaagccac caaccagaag 2460
 ggctctgtgg aaagttcagc atacctcact gttcaaggaa cctcggacaa gtctaattctg 2520
 gagctgatca ctctaacatg cacctgtgtg gctgcgactc tcttctggct cctattaacc 2580
 ctccittatcc gaaaaatgaa aaggtcttct tctgaaataa agactgacta cctatcaatt 2640
 ataatggacc cagatgaagt tcctttggat gagcagtgtg agcggctccc ttatgatgcc 2700
 agcaagtggg agtttgcccg ggagagactt aaactgggca aatcacttgg aagaggggct 2760
 tttgaaaaag tggttcaagc atcagcattt ggcattaaga aatcacctac gtgccggact 2820
 gtggctgtga aaatgctgaa agagggggcc acggccagcg agtacaaagc tctgatgact 2880
 gagctaaaaa tcttgacca cattggccac catctgaacg tggttaacct gctgggagcc 2940
 tgcaccaagc aaggagggcc tctgatgggtg attgttgaat actgcaaata tggaaatctc 3000
 tccaactacc tcaagagcaa acgtgactta ttttttctca acaaggatgc agcactacac 3060
 atggagccta agaaagaaaa aatggagcca ggccctggaac aaggcaagaa accaagacta 3120
 gatagcgtca ccagcagcga aagctttgcg agctccggct ttcaggaaga taaaagtctg 3180
 agtgatgttg aggaagagga ggattctgac ggtttctaca aggagcccat cactatggaa 3240
 gatctgattt cttacagttt tcaagtggcc agaggcatgg agttcctgtc ttccagaaag 3300
 tgcattcatc gggacctggc agcgagaaac attcttttat ctgagaacaa cgtggtgaag 3360
 atttgtgatt ttggccttgc ccgggatatt tataagaacc ccgattatgt gagaaaagga 3420
 gatactcgac ttcctctgaa atggatggct cccgaatcta tctttgacaa aatctacagc 3480

ES 2 385 396 T3

accaagagcg acgtgtggtc ttacggagta ttgctgtggg aaatcttctc ctaggtggg 3540
 tctccatacc caggagtaca aatggatgag gacttttgca gtcgcctgag ggaaggcatg 3600
 aggatgagag ctcttgagta ctctactcct gaaatctatc agatcatgct ggactgctgg 3660
 cacagagacc caaaagaaag gccaaagattt gcagaacttg tggaaaaact aggtgatttg 3720
 cttcaagcaa atgtacaaca ggatggtaaa gactacatcc caatcaatgc catactgaca 3780
 ggaaatagtg ggtttacata ctcaactcct gccttctctg aggacttctt caaggaaagt 3840
 atttcagctc cgaagtttaa ttcaggaagc tctgatgatg tcagatatgt aaatgctttc 3900
 aagttcatga gcctggaaag aatcaaaacc tttgaagaac ttttaccgaa tgccacctcc 3960
 atgtttgatg actaccaggg cgacagcagc actctgttgg cctctcccat gctgaagcgc 4020
 ttcacctgga ctgacagcaa acccaaggcc tcgctcaaga ttgacttgag agtaaccagt 4080
 aaaagtaagg agtcggggct gtctgatgtc agcaggccca gtttctgcca ttccagctgt 4140
 gggcacgtca gcgaaggcaa gcgcaggttc acctacgacc acgctgagct ggaaaggaaa 4200
 atcgcgtgct gctccccgcc ccagactac aactcgggtg tctgtactc caccaccacc 4260
 atctagagtt tgacacgaag ccttatttct agaagcacat gtgtatttat acccccagga 4320
 aactagcttt tgccagtatt atgcatatat aagtttacac ctttatcttt ccatgggagc 4380
 cagctgcttt ttgtgatttt tttaatagtg cttttttttt ttgactaaca agaatgtaac 4440
 tccagataga gaaatagtga caagtgaaga acactactgc taaatcctca tgttactcag 4500
 tgttagagaa atccttctta aaccaatga ctccctgct ccaacccccg ccacctcagg 4560
 gcacgcagga ccagtttgat tgaggagctg cactgatcac ccaatgcac acgtacccca 4620
 ctgggccagc cctgcagccc aaaaccagc gcaacaagcc cgttagcccc aggggatcac 4680

tggctggcct gagcaacatc tcgggagtcc tctagcaggc ctaagacatg tgaggaggaa 4740
 aaggaaaaaa agcaaaaagc aaggagaaaa agagaaaccg ggagaaggca tgagaaagaa 4800
 tttgagacgc accatgtggg cacggagggg gacggggctc agcaatgcca tttcagtggc 4860
 ttcccagctc tgacccttct acatttgagg gccagccag gagcagatgg acagcgatga 4920
 ggggacattt tctggattct gggaggcaag aaaaggacaa atatctttt tggaactaaa 4980
 gcaaatttta gaccttiacc tatggaagtg gttctatgtc cattctcatt cgtggcatgt 5040
 tttgatttgt agcactgagg gtggcactca actctgagcc catacttttg gctcctctag 5100
 taagatgcac tgaaaactta gccagagtta ggttgtctcc aggccatgat ggccttacac 5160
 tgaaaatgtc acattctatt ttgggtatta atatatagtc cagacactta actcaatttc 5220
 ttggtattat tctgttttgc acagttagtt gtgaaagaaa gctgagaaga atgaaaatgc 5280
 agtcctgagg agagtlttct ccatatcaaa acgagggctg atggaggaaa aaggtcaata 5340
 aggtcaaggg aagaccccggt ctctatacca accaaaccaa ttcaccaaca cagttgggac 5400
 ccaaaacaca ggaagtcagt cacgtttcct tttcatitaa tggggattcc actatctcac 5460
 actaatctga aaggatgtgg aagagcatta gctggcgcat attaagcact ttaagctcct 5520
 tgagtaaaaa ggtggtatgt aatttatgca aggtatttct ccagttggga ctcaggatat 5580
 tagttaatga gccatcacta gaagaaaagc ccattttcaa ctgctttgaa acttgccctgg 5640
 ggtctgagca tgatgggaat agggagacag ggtaggaaaag ggcgccctact cttcagggtc 5700
 taaagatcaa gtgggccttg gatcgctaag ctggctctgt ttgatgctat ttatgcaagt 5760
 tagggtctat gtattta 5777

<210> 45
 <211> 1338
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

ES 2 385 396 T3

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	1	5	10	15
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	Pro	20	25	30	
Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Thr	Gln	His	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gln	Thr	35	40	45	
Leu	His	Leu	Gln	Cys	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	His	Lys	Trp	Ser	Leu	Pro	50	55	60	
Glu	Met	Val	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Ala	65	70	75	80
Cys	Gly	Arg	Asn	Gly	Lys	Gln	Phe	Cys	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Thr	85	90	95	
Ala	Gln	Ala	Asn	His	Thr	Gly	Phe	Tyr	Ser	Cys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Val	100	105	110	
Pro	Thr	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Thr	Glu	Ser	Ala	Ile	Tyr	Ile	Phe	Ile	115	120	125	
Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	130	135	140	
Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	145	150	155	160
Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	165	170	175	
Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	180	185	190	
Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu				

ES 2 385 396 T3

195	200	205
Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg		
210	215	220
Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val		
225	230	235 240
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr		
245	250	255
Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys		
260	265	270
Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His		
275	280	285
Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys		
290	295	300
Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys		
305	310	315 320
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val		
325	330	335
Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser		
340	345	350
Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val		
355	360	365
Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu		
370	375	380
Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala		
385	390	395 400
Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys		
405	410	415

ES 2 385 396 T3

Asn	Leu	Thr	Ala	Thr	Leu	Ile	Val	Asn	Val	Lys	Pro	Gln	Ile	Tyr	Glu	420	425	430
Lys	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Asp	Pro	Ala	Leu	Tyr	Pro	Leu	Gly	Ser	435	440	445
Arg	Gln	Ile	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gln	Pro	Thr	Ile	450	455	460
Lys	Trp	Phe	Trp	His	Pro	Cys	Asn	His	Asn	His	Ser	Glu	Ala	Arg	Cys	465	470	475
Asp	Phe	Cys	Ser	Asn	Asn	Glu	Glu	Ser	Phe	Ile	Leu	Asp	Ala	Asp	Ser	485	490	495
Asn	Met	Gly	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Ile	Thr	Gln	Arg	Met	Ala	Ile	Ile	500	505	510
Glu	Gly	Lys	Asn	Lys	Met	Ala	Ser	Thr	Leu	Val	Val	Ala	Asp	Ser	Arg	515	520	525
Ile	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ile	Cys	Ile	Ala	Ser	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Val	530	535	540
Gly	Arg	Asn	Ile	Ser	Phe	Tyr	Ile	Thr	Asp	Val	Pro	Asn	Gly	Phe	His	545	550	555
Val	Asn	Leu	Glu	Lys	Met	Pro	Thr	Glu	Gly	Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Ser	565	570	575
Cys	Thr	Val	Asn	Lys	Phe	Leu	Tyr	Arg	Asp	Val	Thr	Trp	Ile	Leu	Leu	580	585	590
Arg	Thr	Val	Asn	Asn	Arg	Thr	Met	His	Tyr	Ser	Ile	Ser	Lys	Gln	Lys	595	600	605
Met	Ala	Ile	Thr	Lys	Glu	His	Ser	Ile	Thr	Leu	Asn	Leu	Thr	Ile	Met	610	615	620
Asn	Val	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Ala	Cys	Arg	Ala	Arg	Asn	625	630	635
																		640

ES 2 385 396 T3

Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg		
	645	655
Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val		
	660	670
Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro		
	675	685
Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu		
	690	700
Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg		
705	710	720
Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln		
	725	735
Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Gly Thr Ser		
	740	750
Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr Cys Thr Cys Val Ala		
	755	765
Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile Arg Lys Met Lys		
	770	780
Arg Ser Ser Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp		
785	790	800
Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp		
	805	815
Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu Gly Lys Ser		
	820	830
Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Gln Ala Ser Ala Phe Gly		
	835	845
Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys		

850	855	860
Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys		
865	870	875 880
Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly		
	885	890 895
Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys		
	900	905 910
Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe		
	915	920 925
Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys		
	930	935 940
Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val		
	945	950 955 960
Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser		
	965	970 975
Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu		
	980	985 990
Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg		
	995	1000 1005
Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu		
	1010	1015 1020
Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile		
	1025	1030 1035
Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr		
	1040	1045 1050
Val Arg Lys Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro		
	1055	1060 1065

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

ES 2 385 396 T3

Ser	Lys	Glu	Ser	Gly	Leu	Ser	Asp	Val	Ser	Arg	Pro	Ser	Phe	Cys
1280						1285					1290			
His	Ser	Ser	Cys	Gly	His	Val	Ser	Glu	Gly	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr
1295						1300					1305			
Tyr	Asp	His	Ala	Glu	Leu	Glu	Arg	Lys	Ile	Ala	Cys	Cys	Ser	Pro
1310						1315					1320			
Pro	Pro	Asp	Tyr	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro	Ile
1325						1330					1335			

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas.
2. Un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos y en donde el péptido no es NLTATLAVNV.
3. El péptido de la reivindicación 2, en donde el segundo aminoácido a partir del extremo N es leucina o metionina.
4. El péptido de la reivindicación 2 o 3, en donde el aminoácido C-terminal es valina o leucina.
5. Una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos de la reivindicación 1 o 2.
6. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis o tumores, en donde la composición comprende uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas; y
 - (b) un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos;
 o un polinucleótido que codifica dicho péptido.
7. Uso de un péptido como se define en la reivindicación 6 o un polinucleótido que codifica dicho péptido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de tumores o una enfermedad mediada por angiogénesis.
8. Un exosoma que presenta en su superficie un complejo que comprende un péptido como se define en la reivindicación 6 y un antígeno HLA.
9. El exosoma de la reivindicación 8, en donde el antígeno HLA es HLA-A02.
10. El exosoma de la reivindicación 9, en donde el antígeno HLA es HLA-A0201.
11. Una célula presentadora de antígeno, que comprende un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido como se define en la reivindicación 6.
12. Una vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis, en donde la vacuna comprende uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas;
 - (b) un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 13, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos; y
 - (c) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 o un polinucleótido que codifica dicho péptido como el principio activo.
13. La vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis según la reivindicación 12 para su uso en la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02.
14. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis, en donde la composición comprende uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde el péptido tiene inducibilidad de células T citotóxicas; y
 - (b) un péptido que tiene inducibilidad de células T citotóxicas, en donde el péptido consiste en la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde se sustituyen o añaden 1 o 2 aminoácidos.
15. El uso de la reivindicación 7, en donde la enfermedad mediada por angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis y aterosclerosis.

- 5 16. La vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis según la reivindicación 12 o la composición para su uso en tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por angiogénesis según la reivindicación 6 o 14, en donde la enfermedad mediada por angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, artritis reumatoide crónica, psoriasis y aterosclerosis.

Fig.1

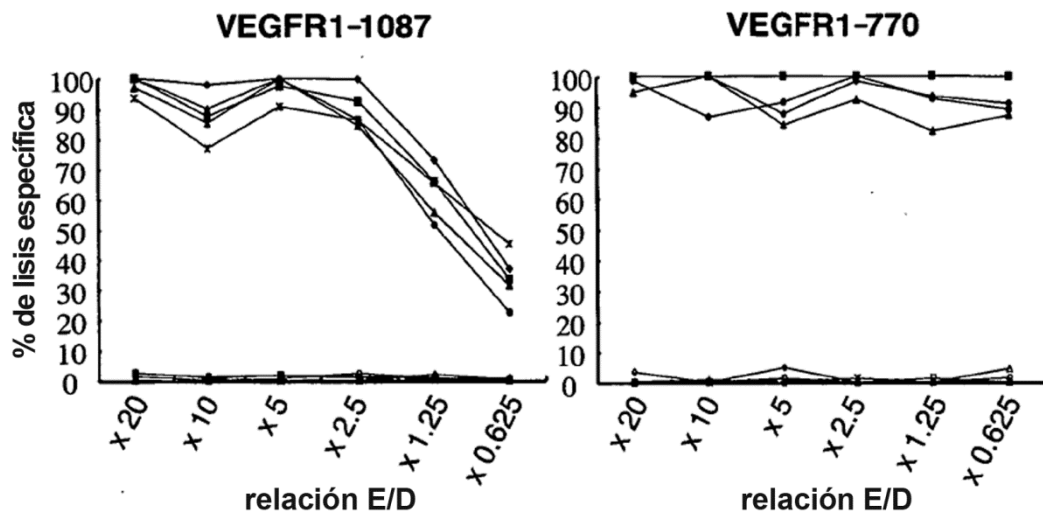


Fig. 2

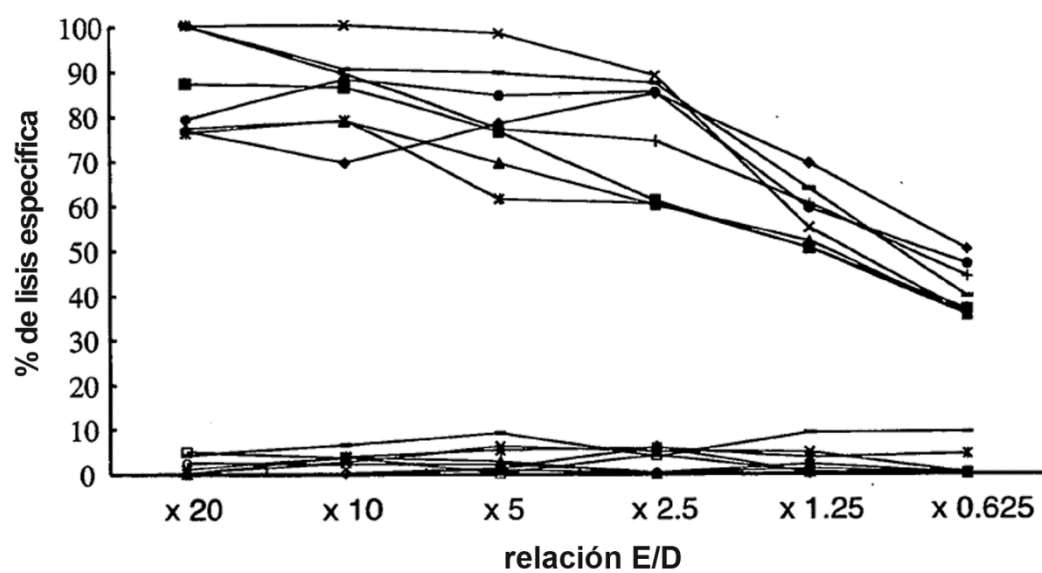


Fig. 3

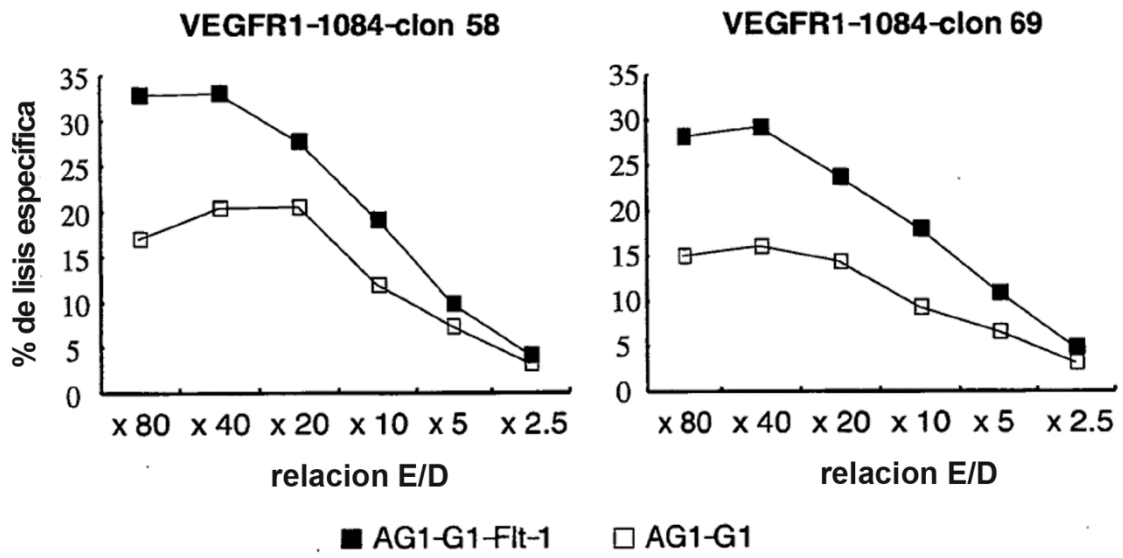


Fig. 4

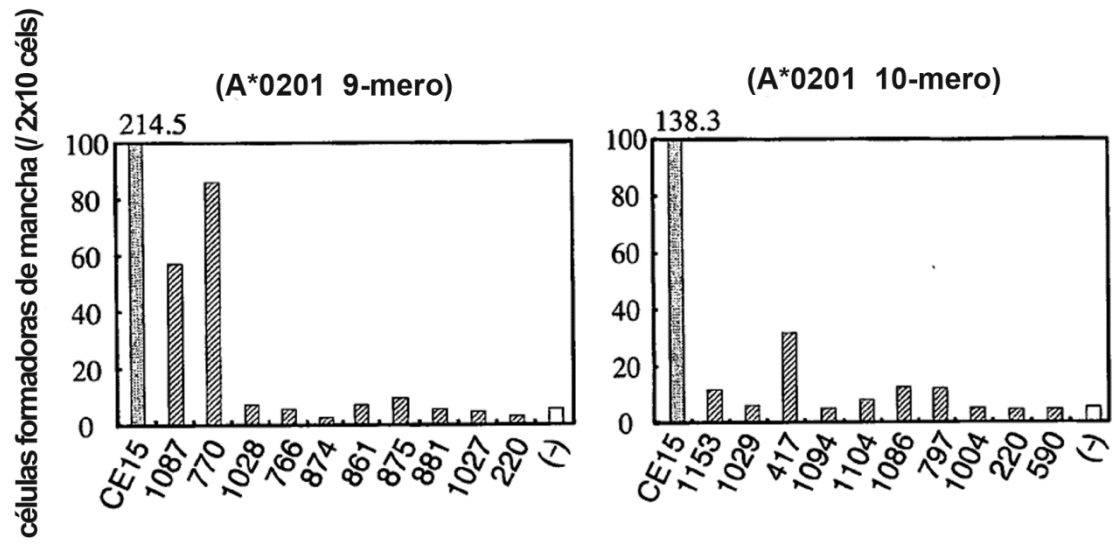


Fig. 5

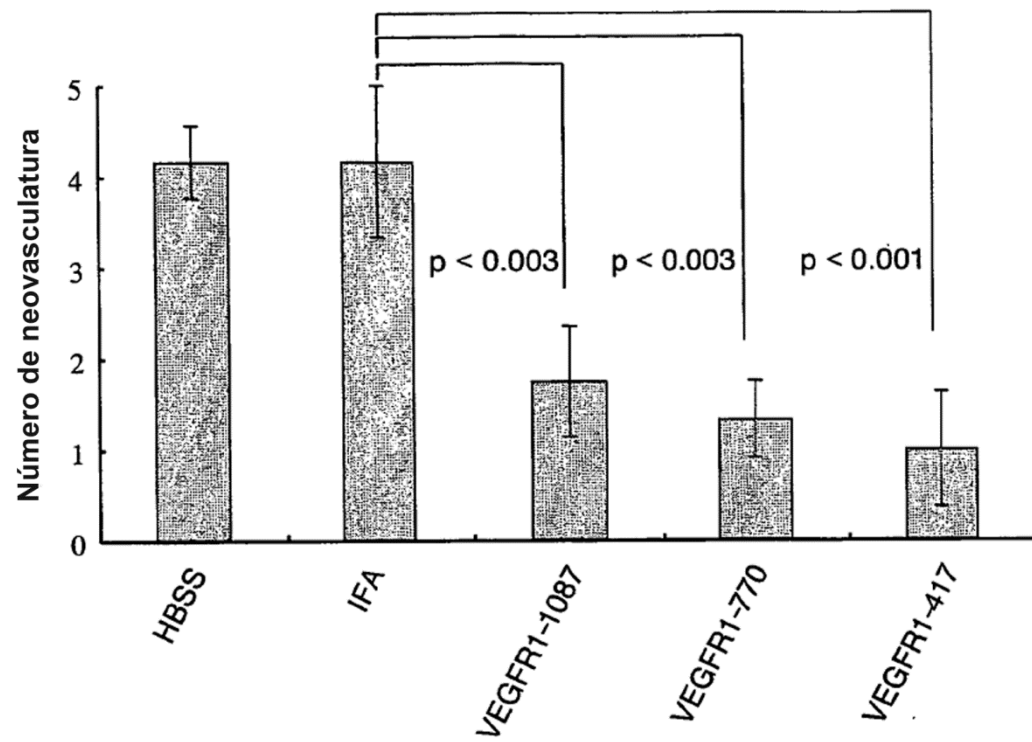


Fig. 6

