

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 405 763**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2008 E 08711317 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2119447**

(54) Título: **Vacunoterapia para la neovascularización coroidea**

(30) Prioridad:

16.02.2007 JP 2007036318

(73) Titular/es:

**ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (100.0%)
2-1, SAKADO 3-CHOME, TAKATSU-KU
KAWASAKI-SHI, KANAGAWA 213-0012, JP**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2013

(72) Inventor/es:

**TAMAKI, YASUHIRO y
TAHARA, HIDEAKI**

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 763 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunoterapia para la neovascularización coroidea.

Campo técnico

La presente invención se refiere a agentes farmacéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). La presente descripción se refiere también a agentes inhibidores de la neovascularización en la coroides.

Técnica anterior

La degeneración macular exudativa asociada a la edad (AMD) causada por la neovascularización coroidea (CNV) es una de las principales causas de deficiencia visual grave en los países desarrollados. Hasta la fecha las pruebas dan a entender que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) desempeña un papel central en el desarrollo de la neovascularización coroidea. Por ejemplo, se ha publicado que la neovascularización coroidea es reducida por los compuestos que inhiben la producción de VEGF o los compuestos que inhiben la ruta de transducción de señales del VEGF. Además, se ha publicado también que los anticuerpos anti-VEGF presentan una eficacia terapéutica más alta en comparación con los métodos terapéuticos convencionales incluyendo la terapia fotodinámica. Por lo tanto, en los últimos años, los agentes anti-VEGF han llegado a ser una opción importante en la farmacoterapia frente a la neovascularización coroidea.

La señalización de VEGF está mediada por dos tipos de receptores tirosina cinasas, esto es VEGFR-1 y VEGFR-2. Los dos receptores se expresan en la membrana de neovascularización coroidea humana y en la membrana de neovascularización coroidea de ratón de laboratorio. Sin embargo, el papel de la ruta de transducción de señales del VEGFR-1 en la neovascularización coroidea todavía es motivo de controversia. Por ejemplo, un estudio indica que la inhibición de la señalización de VEGFR-1 por la administración oral de un anticuerpo, por modificación (knockdown) genética, o por siRNA (RNA de silenciamiento) inhibe la neovascularización coroidea. Otro estudio indica que en el ojo, la activación de VEGFR-1 por el VEGF o por el factor de crecimiento placentario 1 (PIGF1), que es un ligando de VEGFR-2, lleva a la activación de la neovascularización coroidea mediante la activación de VEGFR-2 por SPARC (secreción de proteínas ácidas ricas en cisteína).

Por otro lado, para el VEGFR-2, el hallazgo de que la activación de la señalización de VEGFR-2 promueve el crecimiento de la neovascularización coroidea, es generalmente aceptado. Por lo tanto, se espera que las estrategias antiangiogénicas dirigidas hacia el VEGFR-2, tales como la administración sistémica o local de agentes anti-VEGFR-2 o anticuerpos del VEGFR-2, y la administración intravítreo de siRNA, inhiban la señalización del VEGFR-2 y el crecimiento de la neovascularización coroidea.

Sin embargo, el problema con los agentes anti-VEGF actualmente disponibles es que necesitan ser inyectados repetidamente a intervalos de 4 a 6 semanas. Además, hay un alto riesgo de graves complicaciones tales como endoftalmitis y desprendimiento de retina. Por lo tanto, es deseable establecer un nuevo método terapéutico que reemplace a los agentes anti-VEGF usados actualmente.

Se sabe que una vacuna que utilice un péptido derivado del receptor 2 de VEGF humano induce los linfocitos T citotóxicos (CTL) que tienen una potente citotoxicidad frente a las células endoteliales que expresan el VEGFR-2 en los tejidos tumorales (Documento de Patente 1). Sin embargo, no se conoce ninguna vacuna que induzca los linfocitos T citotóxicos (CTL) en la coroides. Además, hay muchos aspectos que no están claros en el mecanismo de la neovascularización en la coroides y en otros tejidos.

Se muestra a continuación un documento de la técnica anterior. (Documento de Patente 1) WO/2004/024766.

Descripción de la invención

La invención se refiere a las realizaciones definidas en las reivindicaciones.

Problemas a resolver por la invención

La presente invención se hizo en vista de las anteriores circunstancias. Un objetivo a alcanzar por la presente invención es proporcionar nuevos agentes farmacéuticos que se dirijan al VEGFR-2 que es conocido como una de las proteínas implicadas en la neovascularización coroidea, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). Otro objetivo de la presente descripción es proporcionar agentes para la inhibición de la neovascularización coroidea.

Medios para resolver los problemas

Para alcanzar los objetivos mencionados, los presentes inventores se concentraron sobre el VEGFR-2, que es conocido como una de las proteínas implicadas en la neovascularización coroidea. Específicamente, los presentes inventores administraron una vacuna que contiene un péptido derivado de VEGFR-2 como antígeno, a los ratones modelo (ratones transgénicos A2/Kb) que expresan HLA-A*0201 humano, y analizaron el efecto de la vacuna. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que la vacuna que contiene el péptido como antígeno, inhibe la neovascularización coroidea.

Ha habido muchos informes sobre la conexión entre el VEGF y la neovascularización coroidea. Sin embargo, hay muchos aspectos sin aclarar en el mecanismo de la neovascularización en la coroides y en otros tejidos, y todavía es desconocido el papel de VEGFR-1 y VEGFR-2 en la neovascularización. Específicamente, aunque hay informes sobre la aplicación de VEGFR-1 y VEGFR-2 a la vacunoterapia frente a los tumores, ningún informe ha demostrado su aplicación a la vacunoterapia frente a la neovascularización coroidea. Esto indica que los expertos en la técnica reconocen que, aunque se sabe que las vacunas de péptidos derivados de VEGFR-1 y VEGFR-2 inhiben la neovascularización no coroidea, no presentan necesariamente efectos similares en la neovascularización coroidea.

En tales circunstancias, los presentes inventores seleccionaron el VEGFR-2 entre muchos candidatos como un objetivo, y realizaron experimentos. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que una vacuna que contiene un péptido derivado de VEGFR-2 como antígeno, puede inhibir la neovascularización coroidea. Los presentes inventores descubrieron también que la vacuna que contiene un péptido derivado de VEGFR-2 como antígeno, es eficaz no solo para los pacientes con síntomas graves sino también para los casos de pacientes en etapas iniciales con una visión relativamente buena. Específicamente, la presente descripción proporciona los puntos [1] a [36] que siguen:

[1] un agente farmacéutico para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) a (c) que siguen:

- 25 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;
- (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de las células T citotóxicas; y

- 30 (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

- 35 [2] el agente farmacéutico de [1], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de la degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angiomatoides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelioqueratopatías pigmentarias retinianas, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;

- 40 [3] una vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:

- (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
- (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas.

[4] una vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:

- 50 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
- (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a

partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[5] la vacuna de [3], que se administra a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;

5 [6] la vacuna de [4], que se administra a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;

[7] la vacuna de [5] o [6], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de la degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angiomatoides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelio-angiopatías pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;

10 [8] un agente farmacéutico para inhibir la neovascularización coroidea, que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) a (c) que siguen:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;

15 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas; y

20 (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[9] una vacuna para inhibir la neovascularización coroidea, que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y

25 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

30 [10] una vacuna para inhibir la neovascularización coroidea, que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y

35 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[11] la vacuna de [9], que se administra a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;

[12] la vacuna de [10], que se administra a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;

40 [13] un método para tratar y/o prevenir una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprende la etapa de administrar a un sujeto un agente farmacéutico que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) a (c) que siguen:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;

45 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas; y

- (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 5 [14] el método de [13], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioideas, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epiteliotipias pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;
- 10 [15] un método para tratar y/o prevenir una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprende la etapa de administrar a un sujeto una vacuna que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:
- (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
- 15 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- [16] un método para tratar y/o prevenir una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprende la etapa de administrar a un sujeto una vacuna que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:
- 20 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
- (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 25 [17] el método de [15], en donde la administración se realiza a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;
- [18] el método de [16], en donde la administración se realiza a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;
- 30 [19] el método de [17] o [18], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioideas, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epiteliotipias pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;
- [20] un método para inhibir la neovascularización coroidea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un agente farmacéutico que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) a (c) que siguen:
- 35 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;
- (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas; y
- 40 (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 45 [21] un método para inhibir la neovascularización coroidea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una vacuna que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:
- (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
- (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a

partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[22] un método para inhibir la neovascularización coroidea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una vacuna que comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:

- 5 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[23] el método de [21], en donde la administración se realiza a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;

[24] el método de [22], en donde la administración se realiza a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;

[25] el uso de un péptido de cualquiera de (a) a (c) que siguen, en la producción de un agente farmacéutico para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):

- 15 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;
 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas; y
 (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[26] el uso de [25], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angiomatoides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelio-epiteliales pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;

30 [27] el uso de un péptido de (a) o (b) que siguen, en la producción de una vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):

- 35 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[28] el uso de un péptido de (a) o (b) que siguen, en la producción de una vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):

- 40 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

45 [29] el uso de [27], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;

[30] el uso de [28], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;

[31] el uso de [29] o [30], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioideas, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelios pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;

5 [32] el uso de un péptido de cualquiera de (a) a (c) que siguen, en la producción de un agente farmacéutico para la inhibición de la neovascularización coroidea:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;

10 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

15 (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[33] el uso de un péptido de (a) o (b) que siguen, en la producción de una vacuna para la inhibición de la neovascularización coroidea:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y

20 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

25 [34] el uso de un péptido de (a) o (b) que siguen, en la producción de una vacuna para la inhibición de la neovascularización coroidea:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y

30 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[35] el uso de [33], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;

35 [36] el uso de [34], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;

[37] un péptido de cualquiera de (a) a (c) que siguen, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;

40 (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

45 (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[38] el péptido de [37], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica,

estrías angioideas, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epiteliopatías pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;

[39] un péptido de (a) o (b) que siguen, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):

- 5 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
 - (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 10 [40] un péptido de (a) o (b) que siguen, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):
 - (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
 - (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 15 [41] el péptido de [39], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02;
- 20 [42] el péptido de [40], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24;
- 25 [43] el péptido de [41] o [42], en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioideas, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epiteliopatías pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo;
- 30 [44] un péptido de cualquiera de (a) a (c) que siguen, para uso en la inhibición de la neovascularización coroidea:
 - (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;
 - (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas; y
 - (c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 35 [45] un péptido de (a) o (b) que siguen, para uso en la inhibición de la neovascularización coroidea:
 - (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
 - (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
- 40 [46] un péptido de (a) o (b) que siguen, para uso en la inhibición de la neovascularización coroidea:
 - (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
 - (b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es

fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

[47] el péptido de [45], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02; y

5 [48] el péptido de [46], en donde la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta un gráfico que muestra el índice de fuga fluorescente de los neovasos coroideos, evaluado por angiografía fluorescente del fondo de ojo, del grupo de administración de PBS (tampón fosfato salino), del grupo de administración única de IFA (adyuvante incompleto de Freund), y del grupo de vacunación con péptido el séptimo día.

10 La Figura 2 presenta fotografías que muestran un ejemplo de angiografía fluorescente del fondo de ojo, del grupo de administración de PBS, del grupo de administración única de IFA, y del grupo de vacunación con péptido el séptimo día.

15 La Figura 3 presenta un gráfico que muestra el área de la sección transversal de los neovasos coroideos evaluada por angiografía fluorescente del fondo de ojo, del grupo de administración de PBS, del grupo de administración única de IFA, y del grupo de vacunación con péptido el séptimo día.

20 La Figura 4 presenta fotografías que muestran un ejemplo de preparación coroidea extendida del grupo de administración de PBS, del grupo de administración única de IFA, y del grupo de vacunación con péptido el séptimo día.

Modo de realizar la invención

La presente invención se refiere a agentes farmacéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprenden un péptido derivado de VEGFR-2 como ingrediente activo. De aquí en adelante, estos agentes farmacéuticos se pueden denominar como "agentes farmacéuticos de la presente invención". Como se ha descrito antes, la presente invención se basa en el hallazgo de los presentes inventores de que las vacunas que contienen un péptido derivado de VEGFR-2 como antígeno son eficaces para la inhibición de la neovascularización coroidea.

25 La secuencia de aminoácidos del VEGFR-2 humano es conocida, y está descrita, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.861.301. Los expertos en la técnica que tienen acceso a la información descrita en este documento de patente pueden obtener fácilmente VEGFR-2 humano.

30 Un péptido derivado de VEGFR-2 contenido en los agentes farmacéuticos de la presente descripción es preferiblemente un péptido nonámero o decámero parcial. Más específicamente, dichos péptidos incluyen:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12.

35 No hay limitación sobre los péptidos de la presente descripción, siempre que los péptidos tengan una actividad inductora de CTL frente a las células que expresan el VEGFR-2. Más específicamente, los péptidos de la presente invención incluyen también:

(b) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas. Además, se pueden añadir uno o dos aminoácidos al N terminal y/o al C terminal de los péptidos.

40 Además, los péptidos de la presente descripción incluyen también:

(c) un péptido con una o más sustituciones, delecciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas.

45 Los residuos de aminoácidos a ser mutados se mutan preferiblemente en otros aminoácidos en los que se mantienen las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos. Los ejemplos de propiedades de las

cadenas laterales de los aminoácidos incluyen: aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, y V); aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, y T); aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I, y P); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T, e Y); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C y M); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y que contienen amida (D, N, E, y Q); aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen bases (R, K, y H); y aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen anillos aromáticos (H, F, Y, y W) (todos los aminoácidos se representan por códigos de una letra entre paréntesis). La sustitución de aminoácidos dentro de cada uno de estos grupos se llama sustitución conservadora. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada, en el que uno o más residuos aminoácidos se delecianan, se añaden, y/o se reemplazan con otros aminoácidos en una cierta secuencia de aminoácidos, es sabido que retiene su actividad biológica original (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982) 10, 6487-500; Wang, A. et al., Science (1984) 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79: 6409-13).

El número de aminoácidos mutados no está particularmente limitado. En general, el número es siete o menos, preferiblemente cinco o menos, y más preferiblemente tres o menos (por ejemplo, dos o menos). Se puede determinar la identidad de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, utilizando el algoritmo BLAST de Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5873-7).

En la presente descripción, es particularmente preferido un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Además se puede obtener un péptido de la presente descripción sintetizando el péptido a partir de cualquier posición basada en la secuencia de aminoácidos. La síntesis del péptido se puede realizar según métodos convencionalmente usados en la química de péptidos. Los métodos de síntesis convencionales están descritos en documentos tales como "Peptide Synthesis", Interscience, New York, 1966; "The Proteins", Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; "Peptide Synthesis (Peptide Gosei)", Maruzen, 1975; "Fundamentals and Experiments of Peptide Synthesis (Peptide Gosei no Kiso to Jikken)", Maruzen, 1985; y "The sequel of Development of Pharmaceuticals (Zoku Iyakuhin no Kaihatsu)", Vol. 14, Peptide Synthesis (Peptide Gosei), Hirokawa Shoten, 1991, y en publicaciones tales como la Publicación Internacional No. WO99/67288.

Los péptidos de la presente descripción se pueden sintetizar también por métodos conocidos de ingeniería genética. Un ejemplo de los métodos de síntesis de ingeniería genética es el siguiente método. Un vector en el que se ha insertado un DNA que codifica un péptido de interés se introduce en células hospedantes adecuadas para producir células transformadas. Los péptidos de la presente descripción se pueden obtener recogiendo los péptidos producidos en estas células transformadas.

Además, un péptido de la presente descripción se puede producir inicialmente como una proteína de fusión, que se escinde después utilizando una proteasa apropiada para obtener el péptido. En un método para preparar una proteína de fusión, se puede ligar estructuralmente un polinucleótido que codifica un péptido de la presente descripción con un polinucleótido que codifica otro péptido, y éste puede ser insertado en un vector de expresión para la expresión en un hospedante. Se pueden utilizar para este propósito métodos conocidos por los expertos en la técnica. Para péptidos fusionados con los péptidos de la presente descripción, se pueden usar péptidos conocidos tales como FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6x His que consiste en seis residuos de histidina (His), 10xHis, hemaglutinina influenza (HA), fragmentos c-myc humanos, fragmentos VSV-GP, fragmentos p18HIV, T7-tag, HSV-tag, E-tag, fragmentos de antígeno SV40T, Ick tag, fragmentos de α -tubulina, B-tag, y fragmentos de proteína C. Es posible también ligar los péptidos de la presente descripción a glutatión-S-transferasa (GST), hemaglutinina influenza (HA), regiones constantes de inmunoglobulina, β -galactosidasa, proteína de unión a maltosa (MBP), u otros para producir las proteínas de fusión. Los péptidos de la presente descripción se pueden obtener tratando las proteínas de fusión producidas de esta manera con una proteasa adecuada, y recogiendo después los péptidos de interés. Los péptidos se pueden recoger por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como cromatografía de afinidad.

Además, los péptidos de la presente descripción tienen una actividad inductora de células T citotóxicas (actividad inductora de células T mediadas por células) cuando los péptidos se ponen en contacto *in vitro* o *in vivo* con células que tienen capacidad de presentación de antígenos. En particular, los péptidos de la presente descripción tienen preferiblemente una alta afinidad para los antígenos HLA tales como los tipos A-02 y A-24, que se dice que son expresados frecuentemente en la población japonesa. Los antígenos HLA tales como los tipos A-02 y A-24 incluyen subtipos tales como A-0201 y A-2402, respectivamente. Los ejemplos de péptidos que tienen alta afinidad de unión a HLA-A*0201 incluyen los péptidos de las SEQ ID NOs: 1 a 6 (WO/2004/024766).

Los péptidos de la presente descripción incluyen no solamente los péptidos que tienen una alta afinidad de unión a HLA-A*0201, sino también los péptidos que tienen una alta afinidad de unión a otros tipos de antígenos HLA (por

ejemplo, HLA-A*2402). Entre tales péptidos, los ejemplos de péptidos que tienen alta afinidad de unión a HLA-A*2402 incluyen los péptidos de las SEQ ID NOs: 7 a 12.

Una vez que se confirma la eficacia vacunal de un péptido derivado de una cierta proteína, los expertos en la técnica pueden buscar fácilmente otros péptidos que tengan una alta afinidad de unión con un antígeno HLA a partir de la misma proteína, y analizar el efecto vacunal de los péptidos. Además, los expertos en la técnica pueden buscar fácilmente péptidos que tengan una alta afinidad de unión con antígenos HLA distintos del HLA-A*0201 a partir de la misma proteína, y desarrollar vacunas que se puedan aplicar a diferentes grupos raciales. Es bien conocido entre los expertos en la técnica que, cuando un péptido derivado de una cierta proteína activa la reacción inmunitaria frente a la proteína, un péptido derivado de la misma proteína que muestre una alta afinidad para otro antígeno HLA activa también la reacción inmunitaria frente a la proteína, siempre que el péptido tenga actividad para inducir los CTL frente a la proteína. Más específicamente, es bien conocido entre los expertos en la técnica que cuando un péptido derivado de VEGFR-2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) inhibe la neovascularización activando la reacción inmunitaria frente a VEGFR-2, un péptido derivado de VEGFR-2 que presenta una alta afinidad para el antígeno HLA (por ejemplo, un péptido que presenta alta afinidad para HLA-A24) inhibe también la neovascularización activando la reacción inmunitaria frente a VEGFR-2, siempre que el péptido tenga actividad para inducir los CTL frente a VEGFR-2.

La unión entre un péptido de la presente descripción y un antígeno HLA se puede medir aislando las células que tienen un antígeno HLA sobre la superficie celular, tales como las células dendríticas, y evaluando la unión del péptido a las células usando métodos convencionales.

Alternativamente, se puede usar el software disponible en internet, tal como el descrito en Parker K. C., J. Immunol. 152, 163-75 (1994), para calcular la afinidad de unión de diferentes péptidos hacia los antígenos HLA *in silico*. La afinidad de unión hacia los antígenos HLA se puede medir según los métodos descritos, por ejemplo, en Parker, K. C., J. Immunol., 152, 163-75 (1994), Nukaya, I., Int. J. Cancer, 80, 92-7 (1999), etc.

En la clínica, determinando por adelantado el tipo de antígeno HLA portado por el paciente que necesita tratamiento, se pueden seleccionar adecuadamente los péptidos que tienen una alta afinidad de unión a este antígeno, o los péptidos que tienen alta actividad para inducir las células T citotóxicas (CTL) mediante presentación de antígeno. Los péptidos seleccionados por tales métodos están incluidos también en los péptidos de la presente descripción.

En la presente invención, "tratamiento" significa la mejoría de los síntomas característicos de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) en pacientes que han desarrollado realmente los síntomas. En la presente invención, no hay ninguna limitación particular sobre el grado de mejoría. Incluso si el grado es muy bajo, está incluido en el significado de "tratamiento" de la presente invención, siempre que se puedan mejorar los síntomas.

En la presente invención, "prevención" significa reducir por adelantado el desarrollo de los síntomas característicos de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). En la presente invención, no hay ninguna limitación sobre el grado de reducción del desarrollo. Incluso si el grado es muy bajo, está incluido en el significado de "prevención" de la presente invención, siempre que se pueda reducir el desarrollo.

La reducción de la visión es un síntoma de las enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). La determinación de si este síntoma ha mejorado o no, se puede evaluar por el ensayo de visión. Además, la actividad de los neovasos coroideos se puede evaluar por un examen que utiliza la angiografía fluorescente del fondo de ojo o dispositivos de tomografía de coherencia óptica.

Los péptidos de la presente invención se pueden utilizar solos para el tratamiento y/o prevención. Alternativamente, los péptidos se pueden formular por métodos convencionales de formulación. En estos casos, se pueden incluir apropiadamente los vehículos, excipientes, y otros, convencionalmente usados para los productos farmacéuticos en adición a los péptidos de la presente descripción. Por ejemplo, se pueden usar parenteralmente en la forma de soluciones o suspensiones inyectables estériles preparadas con agua o con otros líquidos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se pueden formular combinándolos apropiadamente con vehículos o medios farmacéuticamente aceptables, más específicamente, agua esterilizada o solución salina fisiológica, aceites vegetales, emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, agentes aromatizantes, excipientes, vehículos, conservantes, agentes aglutinantes, y otros, y mezclándolos en una forma farmacéutica unitaria requerida, según la práctica farmacéutica generalmente aceptada. La cantidad de ingrediente activo en las formulaciones se ajusta de forma que se consiga una dosis apropiada dentro del intervalo especificado.

Los péptidos de la presente descripción se pueden usar como vacunas para inducir los CTL *in vivo*, ya sea en forma singular o como una combinación de dos o más tipos. Más específicamente, la presente invención se refiere a vacunas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), que comprenden un péptido derivado de VEGFR-2 como ingrediente activo. Administrando un péptido de la presente descripción, el péptido se expone con una alta densidad sobre el antígeno

- 5 HLA de las células presentadoras de antígeno, y esto induce los CTL que reaccionan específicamente con el complejo expuesto formado entre el péptido y el antígeno HLA, y se aumenta la capacidad de ataque frente a las células endoteliales vasculares de la coroides. Alternativamente, se separan las células dendríticas de un paciente y se estimulan con un péptido de la presente invención para obtener células presentadoras de antígeno que tienen el péptido de la presente descripción unido sobre la superficie celular. Al administrar las células al paciente, se inducen los CTL en el paciente, y de este modo se puede aumentar la capacidad de ataque frente a las células diana.
- 10 Cuando se usan los péptidos de la presente descripción como vacunas, se pueden administrar junto con un adyuvante de forma que se establezca de forma efectiva la inmunidad celular, se pueden administrar junto con otros 10 ingredientes activos tales como agentes anticáncer, o se pueden administrar como formulaciones en forma de partículas. Se pueden aplicar adyuvantes tales como los descritos en el documento, Johnson A G., Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994. También se pueden usar preparaciones en liposomas, preparaciones en forma de partículas producidas mediante la unión a perlas de pocos micrómetros de diámetro, preparaciones unidas a lípidos, y otras.
- 15 Los expertos en la técnica pueden planificar adecuadamente el método, la dosis, y el período de administración de una vacuna de la presente descripción dependiendo de los síntomas del paciente (sujeto) que necesite la administración de la vacuna de la presente descripción. Las vacunas de la presente descripción se pueden administrar tanto sistémicamente como localmente. Los ejemplos de administración sistémica incluyen administración oral, administración intradérmica, administración subcutánea, e inyección intravenosa. Los ejemplos 15 de administración local incluyen la administración en la proximidad de la coroides.
- 20 La dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 mg a 1000 mg, preferiblemente de 0,001 mg a 1000 mg, y más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg, pero no se limita a esto. Las vacunas se administran preferiblemente una vez cada pocos días o meses, pero la frecuencia no se limita a esto.
- 25 Los agentes farmacéuticos de la presente invención son eficaces frente a enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). No hay limitación sobre las enfermedades diana de los agentes farmacéuticos de la presente invención, siempre que sean enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). Preferiblemente, las enfermedades incluyen la maculopatía neovascular que acompaña a enfermedades tales como la degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelios pigmentarios retinianos, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo. Un ejemplo particularmente preferido es 25 la degeneración macular exudativa asociada a la edad.
- 30 Los agentes farmacéuticos de la presente descripción tienen un bajo riesgo de una rápida reducción visual y de desarrollo de graves complicaciones post-tratamiento, que son problemas de los métodos terapéuticos convencionales. Por lo tanto, los agentes farmacéuticos de la presente descripción se pueden aplicar no solo a los pacientes con síntomas graves sino también a los pacientes en las etapas iniciales con visión relativamente buena. Puesto que el daño de la retina es bajo en los casos en etapas iniciales con visión relativamente buena, se espera 30 que el pronóstico visual post-tratamiento para los casos avanzados sea mucho más favorable que en el tratamiento convencional.
- 35 La presente descripción se basa en el hallazgo de que las vacunas que contienen un péptido derivado de VEGFR-2 como antígeno dañan las células endoteliales vasculares al inducir la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Por lo tanto, la presente descripción proporciona agentes para inhibir la neovascularización coroidea, que comprenden un péptido derivado de VEGFR-2 como ingrediente activo. Anteriormente se han mencionado 35 descripciones específicas del péptido derivado de VEGFR-2. En la presente descripción, no hay limitación sobre el grado de inhibición. Incluso si el grado es muy bajo, está incluido en el significado de "inhibición" siempre que la neovascularización pueda ser inhibida.
- 40 Los agentes inhibidores de la presente descripción se pueden usar en la forma de vacunas. Más específicamente, la presente descripción proporciona vacunas para inhibir la neovascularización coroidea, que comprenden un péptido derivado de VEGFR-2 como ingrediente activo. Anteriormente se han mencionado descripciones específicas de las vacunas, p. ej., sitios, métodos, y dosis de administración de las vacunas.
- 45
- 50 **Ejemplos**
- De aquí en adelante, la presente invención será descrita específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no se debe interpretar que se limita a los mismos.

Métodos

Animales

Se obtuvieron ratones C57bl/6 con un peso corporal de 20 g a 25 g de CLEA Japan (Tokio, Japón). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el Comité de uso y cuidado animal y la Declaración para el uso de animales en la investigación oftálmica y de visión de la Asociación para Investigación en Visión y Oftalmología. Los ratones utilizados en los experimentos expresan el HLA-A*0201 humano.

Péptidos antigenicos

Se separaron los ratones en tres grupos. Se inyectaron subcutáneamente en las axilas dos veces (día 0 y día 10), PBS (tampón fosfato salino), un adyuvante de inmunidad (adyuvante incompleto de Freund (IFA)), o una suspensión de un péptido antigenico derivado del receptor VEGF 2 e IFA. El péptido consiste en nueve aminoácidos desde la posición 773 del VEGFR-2 humano, VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 2), que se confirmó que tiene un efecto antiangiogénico en un modelo de tumor. Posteriormente, el día 20, se indujo la neovascularización coroidea en tres sitios en ambos ojos utilizando un láser semiconductor fijado a ϕ 200 μm , 200 mW, y 0,02 segundos.

Neovascularización coroidea (CNV) experimental

La neovascularización coroidea experimental fue inducida como se describe en otro lugar con modificaciones menores. En resumen, se indujo la anestesia general con una inyección intraperitoneal (1 mL/kg) de una mezcla (1:1) de hidrocloruro de ketamina (Ketalar®, Sankyo, Tokio, Japón) e hidrocloruro de xilazina (Celactal®, Bayer, Tokio, Japón). Se dilató la pupila utilizando una gota de tropicamida al 0,5 % (Mydrin® M, Santen Pharmaceutical, Osaka, Japón) para fotocoagulación. Se aplicaron seis fotocoagulaciones por láser a cada ojo entre los vasos retinianos mayores alrededor del disco óptico con un fotocoagulador láser de diodos (DC-3000®, NIDEK, Osaka, Japón) y un sistema de administración con lámpara de rendija (SL150, Topcon, Tokio, Japón) con un tamaño de punto de 200 mm, duración de 0,02 segundos, e intensidad de 200 mW.

Evaluación del grado de neovascularización coroidea mediante angiografía fluoresceínica

Tres días y siete días después de la inducción de la neovascularización coroidea (el día 23 y el día 27), se utilizaron un total de 169 animales para examinar el efecto sobre la fuga procedente de las lesiones de la neovascularización coroidea (el tercer día, el número de animales procedentes del grupo control, del grupo de dosis baja, y del grupo de dosis alta fue de 41, 34, y 18, respectivamente; el séptimo día, el número de animales procedentes del grupo control, del grupo de dosis baja, y del grupo de dosis alta fue de 51, 15, y 10, respectivamente). Ocultando a los observadores la administración, se examinaron las lesiones el tercer día y el séptimo día utilizando el método de angiografía fluoresceínica del fondo de ojo fluorescente como se ha descrito en otro lugar.

Medida del tamaño de neovascularización coroidea mediante preparación microscópica plana coroidea

Se usaron un total de 36 ratones para análisis por preparación microscópica plana de la coroides (el número de ratones de cada grupo el tercer día y el séptimo día fue de 4 y 8, respectivamente). Tres días y siete días después del tratamiento con láser, se evaluó el tamaño de la lesión de la neovascularización coroidea utilizando preparaciones microscópicas planas de la coroides como se ha descrito previamente. Se anestesiaron los ratones y se perfundieron con 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) que contenía 50 mg/mL de dextrano conjugado con FITC (4,4 kDa, 50 mg/kg de peso corporal; Sigma). Despues, se enuclearon los ojos, y se separaron la córnea y la lente, y se diseccionó cuidadosamente la retina completa desde la copa del ojo. Se hicieron cortes radiales desde los bordes del ecuador, y la copa del ojo se montó sobre un portaobjetos plano con la esclerótica mirando hacia abajo. Se observaron las secciones planas preparadas bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus DPSO), y se capturaron las imágenes utilizando una cámara CCD. Se importaron los datos en un ordenador utilizando un sistema de software (Studio lite). Se asignó el contorno de la región de neovascularización coroidea utilizando un ratón de ordenador, y se realizó la medida utilizando un programa público de procesado de imágenes por NIH. Para el análisis estadístico, se calculó la media de los tamaños de las lesiones para dar un valor para cada individuo. Los datos se expresaron como la media \pm error típico.

Análisis estadístico

Se evaluaron las puntuaciones de la angiografía fluoresceínica del fondo de ojo fluorescente utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Se evaluó el tamaño de la lesión de la neovascularización coroidea por ANOVA seguido por la prueba post hoc de Dunnett. Los valores de $P<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos para todas las formas de análisis estadístico utilizado.

Consideraciones éticas

Aunque en esta invención se trabajó para reducir las molestias sufridas por los ratones de acuerdo con el Manual para experimentación animal de la Universidad de Tokio, como se utilizó un adyuvante de Freund para una activación inmunitaria más fuerte, el nivel de sufrimiento es de Categoría C según el Scientists Center for Animal Welfare.

5

Resultados

Efecto sobre la fuga de la neovascularización coroidea

El tercer día, no se observó ninguna diferencia entre el grupo control, el grupo de dosis baja, y el grupo de dosis alta en el grado de fuga de la fluoresceína. La fuga de la fluoresceína desde las lesiones de la neovascularización coroidea en el grupo sin administración aumentó el séptimo día en comparación con el tercer día. La fuga de fluoresceína desde las lesiones de la neovascularización coroidea fue más baja en el grupo de dosis alta que en el control (Figuras 1 y 2). Aunque no fue estadísticamente significativa, la fuga desde las lesiones de neovascularización coroidea fue más baja en los animales del grupo de dosis baja que en los animales del grupo control.

10

Efecto sobre el tamaño de la lesión de neovascularización coroidea

No se observó ninguna diferencia entre el grupo control, el grupo de dosis baja, y el grupo de dosis alta en el tamaño de la lesión de neovascularización coroidea el tercer día. El tamaño medio de la lesión de la neovascularización coroidea en el grupo sin administración fue mayor en el séptimo día que en el tercer día. El tamaño de la lesión de neovascularización coroidea disminuyó significativamente en el grupo de dosis baja y en el grupo de dosis alta en comparación con el grupo control (Figuras 3 y 4).

20

Los presentes inventores demostraron que el péptido VIAMFFWLL(9) (SEQ ID NO: 2) reduce la regulación por incremento del VEGF e inhibe el crecimiento de la neovascularización coroidea. Es conocido que el VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 2) regula las respuestas inmunitarias. Puesto que la activación de la neovascularización coroidea está mediada por el proceso de inflamación, y el efecto inhibidor de VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 2) sobre el crecimiento de la neovascularización coroidea *in vivo* se observó solamente el séptimo día y no el tercer día, es probable que el VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 2) afecte a las respuestas inmunitarias tales como la infiltración de leucocitos, regulando de este modo el proceso de neovascularización, más que inhibiendo la neovascularización coroidea mediante la inhibición de la propia neovascularización.

25

Aplicabilidad industrial

30 La presente invención proporciona agentes farmacéuticos (vacunas) para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular).

35

Convencionalmente, la terapia por láser, la terapia fotodinámica, la terapia operatoria, la farmacoterapia, y otras, se han llevado a cabo como métodos para el tratamiento de enfermedades causadas por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular). Sin embargo, la terapia por láser podría causar la reducción de la visión central.

40

Hay ejemplos de rápida reducción visual después de la terapia fotodinámica en casos con buena visión. En la terapia operatoria, hay un riesgo de complicaciones postoperatorias asociadas con la invasión quirúrgica. En la farmacoterapia, hay un riesgo de serias complicaciones tales como endoftalmitis y desprendimiento de retina debidas a la inyección intraocular. Esto es, las terapias convencionales tienen un alto riesgo de reducción visual debida a los efectos adversos y complicaciones asociados con el tratamiento. Por lo tanto, era difícil tratar los casos en las etapas iniciales con relativamente buena visión.

45

Por otro lado, por lo menos, los agentes farmacéuticos (vacunas) de la presente descripción no producen complicaciones locales en el ojo, por lo que los riesgos mencionados antes es probable que estén ausentes. Por lo tanto, es posible tratar los casos de las etapas iniciales con relativamente buena visión. Además, ya que el daño en la retina es bajo en los casos de las etapas iniciales con relativamente buena visión, se espera que el pronóstico visual post-tratamiento para casos avanzados sea mucho más favorable que en el tratamiento convencional.

En las enfermedades de la presente descripción, es sabido que el ojo contralateral tiene una alta incidencia de desarrollo de neovasos similares. Sin embargo, no hay ningún método establecido para la prevención de neovasos en el ojo contralateral. Se puede esperar que la vacunoterapia de la presente descripción sea eficaz para el tratamiento preventivo del ojo contralateral.

50

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LA UNIVERSIDAD DE TOKIO
<120> Vacunoterapia para la neovascularización coroidea
<130> SEN-A0701P
<150> JP 2007-036318
<151> 2007-02-16
<160> 12
<170> PatentIn version 3.4
<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr
1 5

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

<400> 5

Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
1 5 10

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val Leu
1 5

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

<400> 9

Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met
1 5

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

<400> 10

Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile
1 5

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

<400> 11

Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu
1 5

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

<400> 12

Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un agente farmacéutico para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), en donde el agente farmacéutico comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) a (c) que siguen:

- 5 (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 12;
- (b) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de las células T citotóxicas; y
- 10 (c) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas.
- 15 2. Una vacuna seleccionada del grupo que consiste en (i) e (ii) que siguen:
 - (i) una vacuna para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), en donde la vacuna comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (a) y (b) que siguen:
 - (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6; y
 - 20 (b) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
 - 25 (ii) una vacuna para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular), en donde la vacuna comprende, como ingrediente activo, al menos uno de los péptidos de (c) y (d) que siguen:
 - (c) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
 - 30 (d) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas.
- 3. La vacuna de (i) de la reivindicación 2, que se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02.
- 35 4. La vacuna de (ii) de la reivindicación 2, que se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.
- 40 5. El agente farmacéutico de la reivindicación 1, o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de la degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angiomoides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelioptías pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo.
- 45 6. El uso de un péptido de cualquiera de (a) a (d) que siguen, en la producción de un agente farmacéutico o vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):
 - (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6;
 - (b) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;

- (c) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
(d) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas.
- 5 7. El uso de la reivindicación 6, en donde el péptido es (a) o (b), y en donde el agente farmacéutico o la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02.
- 10 8. El uso de la reivindicación 6, en donde el péptido es (c) o (d), y en donde el agente farmacéutico o la vacuna se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de la degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelioptías pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo.
- 15 10. Un péptido de cualquiera de (a) a (d) que siguen, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular):
(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6;
20 (b) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 6, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal es valina o leucina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas;
(c) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12; y
25 (d) un péptido con una o dos sustituciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 12, en donde el segundo aminoácido a partir del N terminal es fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, y en donde el péptido tiene una actividad inductora de células T citotóxicas.
- 25 11. El péptido de (a) o (b) de la reivindicación 10, en donde el péptido se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A02.
- 30 12. El péptido de (c) o (d) de la reivindicación 10, en donde el péptido se destina para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.
- 35 13. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la enfermedad causada por la neovascularización coroidea (maculopatía neovascular) se selecciona de la degeneración macular exudativa asociada a la edad, degeneración macular miópica, estrías angioides, coriorretinopatía exudativa central, diferentes epitelioptías pigmentarias retinales, atrofia coroidea, coroideremia, y osteoma coroideo.

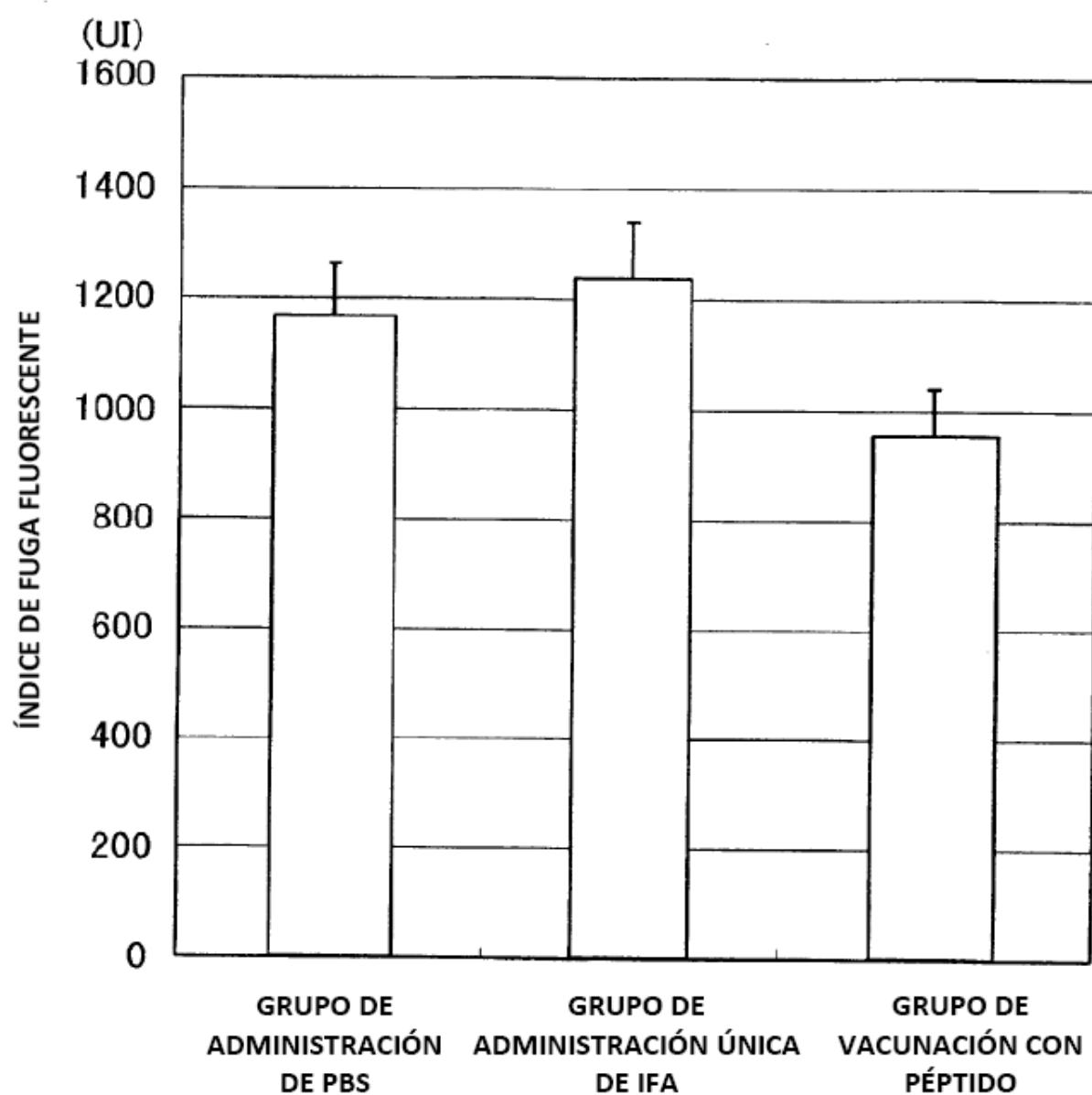
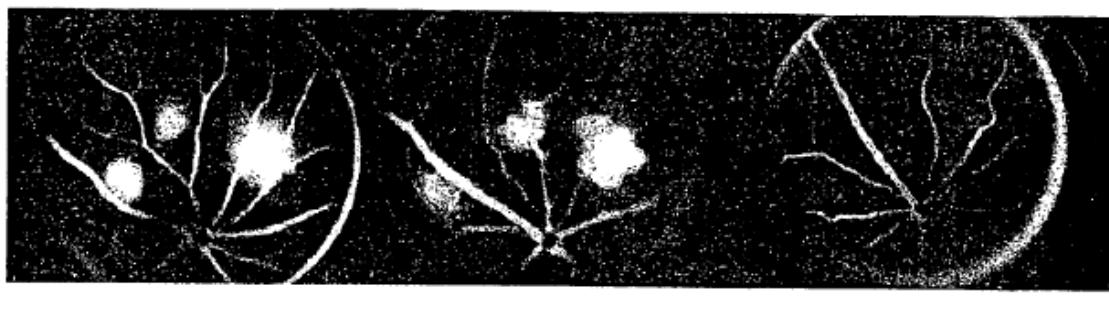


FIG. 1



GRUPO DE ADMINISTRACIÓN DE PBS GRUPO DE ADMINISTRACIÓN ÚNICA DE IFA GRUPO DE VACUNACIÓN CON PÉPTIDO

FIG. 2

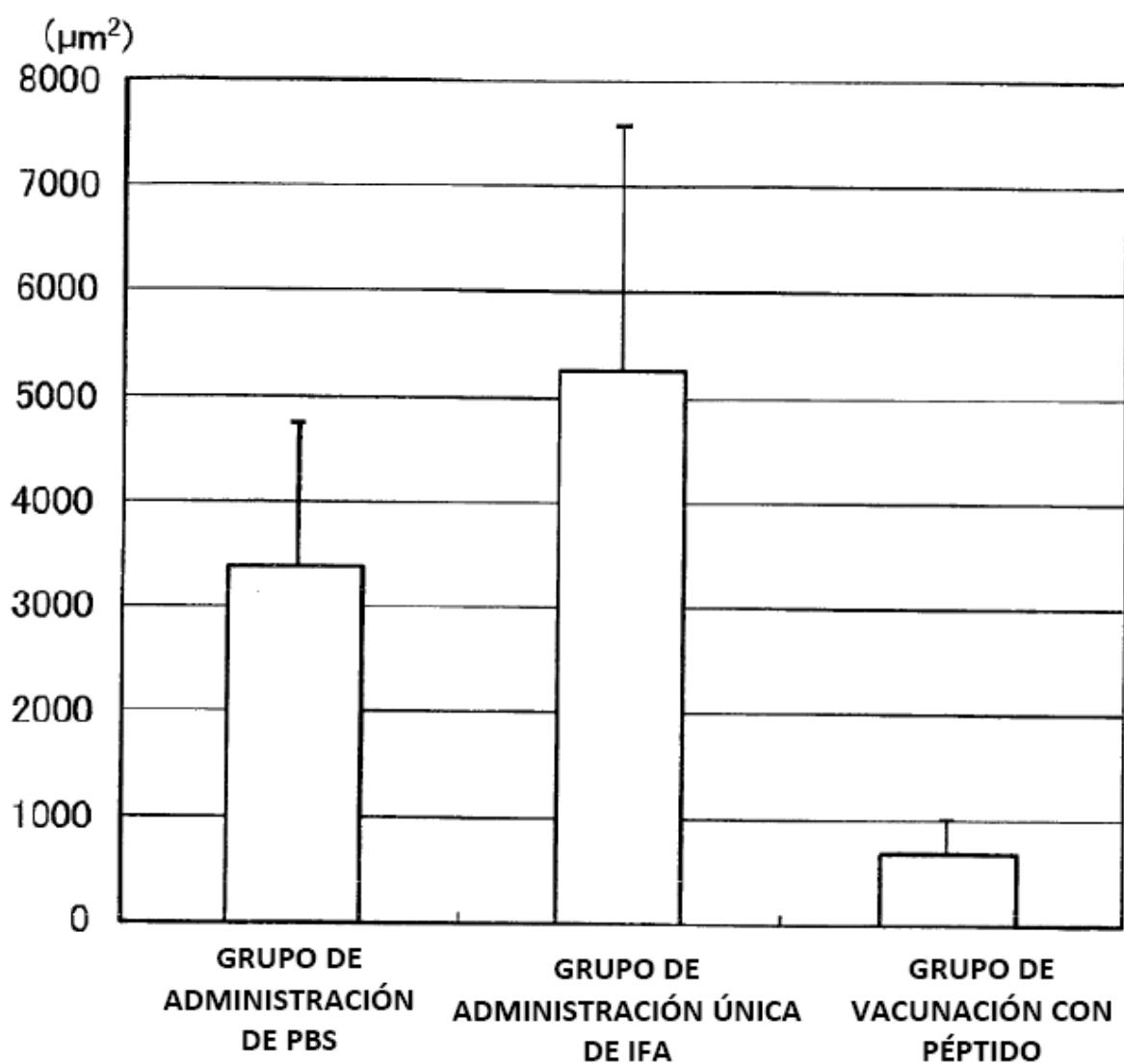
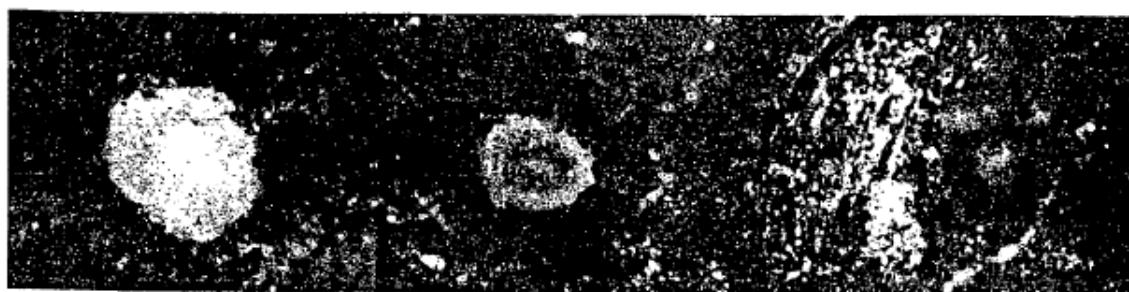


FIG. 3



GRUPO DE GRUPO DE GRUPO DE
ADMINISTRACIÓN ADMINISTRACIÓN ÚNICA VACUNACIÓN CON
DE PBS DE IFA PÉPTIDO

FIG. 4