

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 062**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2005 E 12170985 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2561884**

54 Título: **Péptidos VEGF quiméricos**

30 Prioridad:

**05.02.2004 US 542041 P**

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

**15.06.2017**

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION (100.0%)  
1960 Kenny Road  
Columbus, OH 43210-1063, US**

72 Inventor/es:

**KAUMAYA, PRAVIN y  
COHN, DAVID**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 617 062 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Péptidos VEGF quiméricos

5 Esta solicitud de patente reclama la prioridad de la solicitud provisional de patente U.S. nº 60/542,041 presentada el 5 de febrero de 2004.

**ÁMBITO TÉCNICO DE LA PRESENTE INVENCION**

10 La presente invención se refiere a composiciones para tratar pacientes con malignidades relacionadas con la sobreexpresión del VEGF, en particular el cáncer ovárico. Las composiciones de la presente invención incluyen los péptidos definidos en la reivindicación 1 o 4.

**ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION**

15 El cáncer ovárico es la malignidad ginecológica más letal, de la cual se espera que casi 14.000 mujeres mueran en los Estados Unidos durante 2003 [Jemal]. Desgraciadamente no hay medios efectivos para la detección precoz del cáncer ovárico y más del 75% de los casos se diagnostican cuando la enfermedad ya se ha extendido al abdomen superior o a los nodos linfáticos. A pesar de la quimioterapia citotóxica intensiva tras la cirugía radical para reducir el volumen del cáncer ovárico, la supervivencia media de las mujeres con cáncer ovárico avanzado de gran volumen es inferior a 40 meses [McGuire].

20 Recientes estudios han demostrado el papel crítico de la angiogénesis en el desarrollo del tumor y en la formación de depósitos tumorales metastásicos. La inhibición de la angiogénesis tumoral ha surgido como una modalidad terapéutica nueva y prometedora. Se han identificado varias actividades biológicas involucradas en este complejo proceso, aunque ahora ya se sabe que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los factores proangiogénicos más potentes y específicos, responsable de la angiogénesis inducida por tumores [Leung], y es la diana más prometedora para la inhibición de la angiogénesis inducida por tumores. El VEGF se sobreexpresa en varias malignidades sólidas humanas, incluyendo el cáncer ovárico [Boocock, Olson]. La sobreexpresión del VEGF también se ha visto en mujeres con cáncer ovárico y ha resultado ser un factor de pronóstico malo [Hollingsworth, Paley, Tempfer]. Por tanto el VEGF es una diana lógica contra la cual la inmunización puede tener un papel en el tratamiento o prevención del cáncer ovárico.

25 Para inhibir la función del VEGF se han empleado diversas estrategias, incluyendo el receptor de VEGF (VEGFR) como diana, el uso de técnicas de terapia génica que producen oligonucleótidos antisentido, el uso de VEGFR soluble, el desarrollo de inhibidores de los receptores de tirosina quinasa (RTK) y los anticuerpos monoclonales (Mab) dirigidos contra VEGF [Kim]. El enfoque más prometedor parece ser una versión humanizada recombinante de un Mab murino anti-VEGF humano (rhuMab VEGF, Bevacizumab). Este Mab se ha probado en pacientes con cáncer metastásico [Gordon, Margolin]. Sin embargo el uso de terapia de anticuerpos tiene varios inconvenientes. 30 Las estrategias de inmunización pasiva implican de manera significativa la transferencia de anticuerpos al paciente, pero la inmunidad es efímera, porque los anticuerpos son eliminados de la circulación. Probablemente los propios anticuerpos son con frecuencia inmunogénicos, lo cual limita su empleo a largo plazo. Además una inmunización efectivamente sostenida requiere grandes volúmenes de anticuerpos.

45 El uso de vacunas para prevenir o tratar el cáncer ovárico es un procedimiento muy atractivo porque los efectos secundarios que produce la terapia vacunal son mínimos. Muchos cánceres expresan antígenos asociados al tumor (AAT) que sirven de dianas para las vacunas contra el cáncer. Las estrategias de inmunización han incluido vacunas de células enteras, vacunas de proteínas y de ADN, así como vacunas de péptidos; cada tipo de vacuna antitumoral tiene sus ventajas y limitaciones. Como vacunas contra el cáncer los péptidos son interesantes porque son seguros (libres de patógenos y potencial oncogénico), estables, fáciles de construir y rentables como sistema de vacunación [Dakappagari, Peoples, Kaumaya]. Cabe destacar que las vacunas de péptidos producen respuestas y memoria 50 inmunológica sostenidas, al contrario que la inmunización pasiva. Las limitaciones de las vacunas de péptidos incluyen el hecho de que los péptidos no modificados raramente son inmunogénicos; por tanto el diseño racional de los péptidos es imprescindible para el desarrollo de una vacuna antitumoral eficaz.

55 La patente WO 9839037 (A1) revela una preparación inmunológica que comprende la adición de no menos de dos tipos de moléculas conjugadas para la unión específica simultánea a una región espacialmente expuesta del factor de permeabilidad vascular (VPF) unido in vivo a un vaso sanguíneo asociado a un tumor. Cada tipo de molécula conjugada comprende al menos una porción fijadora de un anticuerpo específico para un epítipo presente en una 60 región espacialmente expuesta de VPF unido, y una porción efectora unida covalentemente a la porción fijadora específica. La preparación inmunológica tiene amplios usos y aplicaciones, incluyendo estudios analíticos, ensayos diagnósticos in vivo y tratamientos terapéuticos in vivo.

**RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION**

65

La presente invención aporta nuevos compuestos (es decir, péptidos) como los definidos en la reivindicación 1 o 4 y composiciones como las definidas en la reivindicación 10 u 11, para estimular el sistema inmunitario y tratar malignidades relacionadas con la sobreexpresión de la proteína VEGF. Además la presente invención proporciona polinucleótidos como los definidos en la reivindicación 12 o 13. En las reivindicaciones 2, 3 y 5 a 9 se definen otras formas de ejecución beneficiosas. Los compuestos son epítomos inmunogénicos de la proteína VEGF humana y de la proteína EG-VEGF humana, y péptidos quiméricos y multivalentes que comprenden dichos epítomos.

En lo sucesivo se alude colectivamente al primer grupo de compuestos como "epítomos de VEGF". Los epítomos de VEGF comprenden aproximadamente 15 hasta 50 aminoácidos, preferiblemente 17 hasta 40 aminoácidos, con mayor preferencia 18 hasta 35 aminoácidos. En un aspecto el epítomo de VEGF mostrado en la siguiente tabla 1 o un equivalente antigénico o funcional del mismo:

Tabla 1

Inmunógeno	Restos	Secuencia de aminoácidos	Estructura secundaria
VEGF	127-144	KCECRPKKDRARQENPCG	Giro-hélice-giro
EG-VEGF	50-67	CTPLGREGEECHPGSHKV	Giro-hélice-giro

En otro aspecto el epítomo de VEGF comprende el aminoácido 4 hasta el aminoácido 21 del VEGF humano (tal como se indica abajo), los aminoácidos 24-38 del VEGF humano, el aminoácido 127 hasta el aminoácido 144 del VEGF humano, el aminoácido 102 hasta el aminoácido 122 del VEGF, el aminoácido 162 hasta el aminoácido 175 del VEGF humano o el aminoácido 76 hasta el aminoácido 96 del VEGF.

La secuencia del VEGF humano es:

```

1      MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLD
61     IFQEYPDEIEYIFKPCVPLMRCGGCSNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
121    SFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTHSRCKARQLELN
181    ERTCRCDKPRR 191
    
```

En otro aspecto el presente epítomo de VEGF comprende el aminoácido 5 hasta el aminoácido 15 de la proteína EG-VEGF humana (tal como se indica abajo), el aminoácido 24 hasta el aminoácido 34 de la EG-VEGF humana, el aminoácido 50 hasta el aminoácido 75 de la EG-VEGF humana o el aminoácido 86 hasta el aminoácido 102 de la EG-VEGF humana.

La secuencia de la EG-VEGF humana es:

```

1 MRGATRVSIMLLLVTVSDCAVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPLGREGEE
    CHPGSHKVPFFRKRKHHTCPCLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNINF105
    
```

En lo sucesivo se alude a los péptidos quiméricos como "péptidos de VEGF quiméricos", los cuales comprenden al menos uno de los presentes epítomos de VEGF o un equivalente antigénico o funcional del mismo. Los péptidos de VEGF quiméricos tienen preferiblemente una longitud aproximada de 35 hasta 150, con mayor preferencia de 35 hasta 70 aminoácidos. Los péptidos de VEGF quiméricos poseen tres unidades. La primera unidad comprende el epítomo de VEGF o un equivalente antigénico o funcional del mismo. La segunda unidad es un epítomo de linfocitos T colaboradores (Th), preferiblemente un epítomo promiscuo de células Th. Tal como se emplea aquí, un "epítomo promiscuo de células Th" es aquel que promueve la liberación de citocinas que ayudan a evitar la restricción del MHC. La segunda unidad tiene una longitud aproximada de 14 hasta 22, preferiblemente de 15 hasta 21, con mayor preferencia de 16 aminoácidos. El epítomo de células Th tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

```

N-S-V-D-D-A-L-I-N-S-T-I-Y-S-Y-F-P-S-V, designado en lo sucesivo como "TT";
P-G-I-N-G-K-A-I-H-L-V-N-N-Q-S-S-E, designado en lo sucesivo como "TT1";
Q-Y-1-K-A-N-S-K-F-I-G-I-T-E-L, designado en lo sucesivo como "P2";
F-N-N-F-T-V-S-F-W-L-R-V-P-K-V-S-A-S-H-L-E, designado en lo sucesivo como "P30";
L-S-E-I-K-G-V-I-V-H-R-L-E-G-V, designado en lo sucesivo como "MVF";
F-F-L-L-T-R-I-L-T-I-P-Q-S-L-N, designado en lo sucesivo como "HBV";
T-C-G-V-G-V-R-V-R-S-R-V-N-A-A-N-K-K-P-E, designado en lo sucesivo como "CSP".
    
```

La tercera unidad del péptido quimérico une las unidades primera y segunda del péptido. La tercera unidad es un aminoácido o, preferiblemente, un péptido con una longitud aproximada de 2 hasta 15 aminoácidos, con mayor preferencia de 2 hasta 10 aminoácidos, sobre todo de 2 hasta 6 aminoácidos. El conector más preferido comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Ser-Leu, SEQ ID n° 20.

La presente invención también proporciona péptidos de VEGF multivalentes, tal como se definen en la reivindicación 4, que comprenden varios, es decir al menos dos, de los presentes epítomos de VEGF o equivalentes antigénicos o

funcionales del mismo y un epítipo de células Th. Los epítipos de VEGF y el epítipo de células Th están unidos a una estructura central de láminas  $\beta$ . Esta estructura comprende dos cadenas de restos alternantes de leucina y lisina unidas por un conector. El conector es un aminoácido o, preferiblemente, un péptido con una longitud aproximada de 2 hasta 15 aminoácidos, con mayor preferencia de 2 hasta 10 aminoácidos, sobre todo de 2 hasta 6 aminoácidos. El conector más preferido comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Ser-Leu, SEQ ID n° 20.

La presente invención también se refiere a una composición inmunogénica, como la definida en la reivindicación 10 u 11, que contiene una mezcla de epítipos de VEGF, un péptido quimérico de VEGF o un péptido multivalente de VEGF y un vehículo farmacológicamente aceptable. En un aspecto, el vehículo es una microesfera biodegradable. Estas composiciones inmunogénicas sirven para tratar malignidades asociadas a la sobreexpresión de la proteína VEGF.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos como los definidos en la reivindicación 12 o 13, que codifican al menos uno de los epítipos de VEGF arriba descritos. Dichos polinucleótidos sirven para preparar el epítipo mediante técnicas de recombinación. La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que poseen una secuencia codificadora de un péptido celular quimérico de VEGF. Dichos polinucleótidos también son útiles en una composición inmunogénica (como p.ej. una vacuna de ADN) para tratar o prevenir malignidades relacionadas con la sobreexpresión de la proteína VEGF. Estas composiciones inmunogénicas se administran preferiblemente por vía intramuscular.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra sueros de alto título que reconocen el epítipo de células B (VEGF) y el inmunógeno (MVF-VEGF) resultante de la inmunización activa con péptidos VEGF. ELISA de sueros de conejo blanco de Nueva Zelanda contra VEGF que pone de manifiesto títulos  $> 1:500.000$  a las 4 semanas de la segunda vacunación de recuerdo (3y+4).

La figura 2 demuestra que los anticuerpos del péptido VEGF reconocen rhVEGF por ELISA. Comparación entre sueros preinmunes de conejo antes de la vacunación (barra 1) y sueros de ratones vacunados con péptidos VEGF (barras 2-4). Las barras 2 y 3 representan sueros de conejo 1 a las 3 y 4 semanas de la segunda vacunación de recuerdo (3y+3 y 3y+4, respectivamente). La barra 4 representa sueros de conejo 2 a un similar sangrado.

La figura 3 muestra un Western blot de rhVEGF identificado con (A) anticuerpo del péptido VEGF o (B) Ab-4, un anticuerpo monoclonal de VEGF, que demuestra el reconocimiento del apropiado dímero proteico recombinante a 42kDa.

La figura 4 demuestra por citometría de flujo con el empleo de células HUVEC que los anticuerpos del péptido VEGF interrumpen la interacción normal VEGF-VEGFR, posiblemente por disminución de VEGF. (A) Evaluación de los controles positivo (PC), negativo (NC) y de anticuerpo inhibidor (IC) en el ensayo de Fluorokine<sup>®</sup> y (B) el mismo PC y NC de (A) más el empleo de anticuerpos de ratón o de conejo contra el péptido VEGF, que pone de manifiesto la interrupción de la interacción normal VEGF-VEGFR. El anticuerpo de conejo, etiquetado como "combo", representa anticuerpos de conejo contra el péptido VEGF tras la inmunización, tanto con el inmunógeno MVF-VEGF como con otro inmunógeno no descrito en esta investigación.

La figura 5 demuestra que los anticuerpos del péptido VEGF interrumpen la angiogénesis en Matrigel<sup>®</sup>. Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con Matrigel<sup>®</sup> incubada con rhVEGF y con o sin anticuerpos de VEGF. A los 10 días se retiraron los tapones, se tiñeron y se contó la invasión vascular sanguínea. Comparada con el control de PBS, la adición de anticuerpos del péptido VEGF interrumpe significativamente la angiogénesis *in vivo*. Ampliación 40x, tinción con Hoechst 33342.

La figura 6 demuestra que los anticuerpos del péptido VEGF interrumpen la angiogénesis en Matrigel<sup>®</sup>. Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con Matrigel<sup>®</sup> incubada con rhVEGF y con o sin anticuerpos del péptido VEGF. A los 10 días se retiraron los tapones, se tiñeron y se contó la invasión vascular sanguínea. Comparada con el control de PBS, la adición de anticuerpos del péptido VEGF interrumpe significativamente la angiogénesis *in vivo*. Cada barra representa el promedio ( $\pm$  ESM) de un grupo de tres ratones.

La figura 7 es un gráfico que muestra anticuerpos anti-péptido de conejo contra epítipos inmunogénicos de (A) VEGF y (B) EGVEGF, con y sin la adición de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF).

La figura 8 muestra la interrupción (A) y el acortamiento (B) de los ciclos estrogénicos, así como (C) un descenso del número de folículos primordiales en la inmunización pasiva con anticuerpos anti-VEGF en un modelo murino.

La figura 9 demuestra que los anticuerpos (A) anti-péptido VEGF y (B) anti-péptido EG-VEGF reconocen rhVEGF y rhEG-VEGF.

La figura 10 muestra Western blots de rhVEGF (A y B) identificados con anticuerpo (A) anti-péptido VEGF y (B) Ab-4, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF. Western blot de rhEG-VEGF (C y D) identificado con (C) anticuerpo de conejo anti-péptido EG-VEGF y (D) anticuerpo de conejo "combinado" anti-péptido VEGF/anti-péptido EG-VEGF, demostrando todos ellos el reconocimiento de la proteína recombinante apropiada.

La figura 11 muestra los resultados de un ensayo de Fluorokine para evaluar las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-péptido VEGF. (A) Evaluación de los controles positivo (PC), negativo (NC) y de anticuerpo inhibidor (IC) en el ensayo de Fluorokine y (B) el mismo PC y NC de (A) más el empleo de anticuerpos de ratón o de conejo contra el péptido VEGF, así como el anticuerpo combinado anti-péptido VEGF/anti-péptido EG-VEGF, que pone de manifiesto la interrupción de la interacción VEGF-receptor de VEGF.

La figura 12 muestra la inyección subcutánea de (A) matrigel y (B) matrigel combinada con rhVEGF, teñida con anticuerpo conjugado con CD31: ficoeritrina, que demuestra el aumento de angiogénesis en ratones C57/BL6.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se describe seguidamente haciendo referencia a formas de ejecución más detalladas y de manera ocasional a las figuras adjuntas. No obstante la presente invención puede adoptar otras formas de ejecución y no debe interpretarse como limitada a las que aquí se exponen, las cuales se ofrecen para que esta revelación resulte minuciosa y completa y transmita plenamente el alcance de la presente invención a los especialistas en la materia.

A no ser que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el significado comúnmente entendido por el especialista en la materia a la cual pertenece la presente invención. La terminología empleada en la exposición de la presente invención solo sirve para describir formas de ejecución particulares y no pretende limitarla. Tal como se usan en la descripción de la presente invención y en las reivindicaciones adjuntas las formas en singular "un", "una" y "el", "la" también incluyen las formas en plural, si el contexto no indica claramente lo contrario.

Si no se indica lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. utilizados en la descripción y en las reivindicaciones deben entenderse como modificables en todos los casos por el término "aproximadamente". Por tanto, de no indicarse lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades que deseen obtenerse mediante la presente invención. Por lo menos y sin pretender limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe ser interpretado según el número de dígitos significativos y las aproximaciones corrientes por redondeo.

Aunque los intervalos y parámetros numéricos que establecen el amplio alcance de la presente invención sean aproximaciones, los valores numéricos revelados en los ejemplos específicos están indicados con la mayor precisión posible. No obstante cualquier valor numérico contiene ciertos errores inherentes derivados inevitablemente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de los ensayos. Cada intervalo numérico indicado a lo largo de esta exposición incluirá el rango más estrecho comprendido en el intervalo numérico más amplio, como si todos los rangos numéricos más estrechos figuraran expresamente escritos en dicho intervalo.

A lo largo de esta revelación se hará referencia a compuestos conforme a la presente invención. La referencia a tales compuestos en la descripción y en las reivindicaciones incluye ésteres y sales de dichos compuestos. Así, aunque no estén enumerados explícitamente, dichos ésteres y sales se consideran contemplados y englobados por la referencia a los propios compuestos.

Asimismo, tal como se usan aquí, "péptido", "polipéptido" y "proteína" son términos intercambiables y se emplearán indistintamente. "Péptido/polipéptido/proteína" se puede emplear para referirse a cualquiera de los tres y la mención de uno de ellos contempla los otros dos, es decir, no se pretende limitar el tamaño del polímero de aminoácidos (péptido, polipéptido o proteína) que puede expresarse con el uso de la presente invención. Además la mención de "proteína" se refiere globalmente a enzimas, hormonas, receptores, canales, moléculas de señalización intracelular y proteínas con otras funciones. Las proteínas multiméricas también se pueden preparar según la presente invención.

Aunque a lo largo de esta revelación se habla de aminoácidos de procedencia natural también se contemplan y caen dentro del alcance de la presente invención aminoácidos no naturales o modificados. En efecto, tal como se usa aquí "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos, todos ellos en sus formas estereoisómeras D y L. Los aminoácidos naturales incluyen alanina (A), arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), cisteína (C), glutamina (Q), ácido glutámico (E), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), lisina (K), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y), valina (V), hidroxiprolina (O y/o Hyp), isoditirosina (IDT) y di-isoditirosina (di-IDT). La hidroxiprolina, la isoditirosina y la di-isoditirosina se forman postranslacionalmente. Se prefiere el uso de aminoácidos naturales, en particular de los 20 aminoácidos codificados genéticamente.

La presente invención proporciona péptidos como los definidos en la reivindicación 1 o 4, los cuales son epítopos inmunogénicos de la proteína VEGF humana y de la proteína EG-VEGF humana, y se designan colectivamente de aquí en adelante como "epítopos de VEGF".

Los epítopos de VEGF y sus equivalentes antigénicos son capaces de provocar una respuesta humoral que tiene como consecuencia la producción de anticuerpos inmunorreactivos con la proteína VEGF humana recombinante y/o con la proteína EG-VEGF humana. Los epítopos de VEGF comprenden péptidos que tienen una de las secuencias designadas en lo sucesivo "secuencias de referencia", tal como las descritas anteriormente. Las secuencias de referencia se seleccionaron y registraron mediante análisis asistido por ordenador, utilizando seis correlatos de antigenicidad: (a) los perfiles de flexibilidad y movilidad de cadena de cada secuencia se calcularon conforme a Karplus y Schultz, Naturwiss 72:212-213, 1985; (b) los perfiles hidrófobos se generaron sobre un tramo limitado de

siete residuos y al final se nivelaron con un tramo de tres residuos, usando la escala de Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982; (c) los perfiles hidrófilos se generaron sobre una ventana de 6 residuos, usando el programa de Hopp y Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828, 1981; (d) el análisis de la exposición al agua de un resto de aminoácido, usando una sonda de 1,4 Å, se realizó por el algoritmo de Rose de exposición al disolvente, Science 229:834-838, 1985; (e) los índices de protrusión que predicen las porciones de las proteínas que son accesibles y protruyen al disolvente se calcularon por el método de Thornton, EMBO J. 5:409-413, 1986; (f) la probabilidad de que una secuencia de cinco residuos fuera antigénica se determinó por el método de Welling, FEBS Lett 188:215-218, 1985. La premisa básica es que los algoritmos utilizados en las predicciones siempre localizarán regiones de superficie expuesta en la proteína y por tanto con mayor probabilidad de implicarse en la fijación de anticuerpos.

A las secuencias se les asignó una puntuación de 1 hasta 6 basada en los valores de sus respectivos índices y se clasificaron del siguiente modo: las secuencias de rango más alto obtuvieron la mayor puntuación en los análisis examinados (6/6) y las sucesivas opciones la subsiguiente puntuación más elevada (5/6), etc. A continuación los epítomos mejor puntuados se clasificaron por correlación con sus atributos estructurales secundarios; se prefiere p.ej. una secuencia anfífilica  $\alpha$ -helicoidal o una región bucle de giro  $\beta$  antes que un fragmento de espiral aleatoria. Para predecir la estructura secundaria (hélice  $\alpha$ , lámina/hebra  $\beta$ , bucle de 3 giros, espiral aleatoria) y el momento anfífilico helicoidal se usaron programas de ordenador de Chou y Fasman, Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem. 47: 45-148, 1978. También se tuvieron en cuenta los pares electrostáticos iónicos y la interacción hélice-dipolo en el segmento helicoidal (p.ej. el balance hidrófobo / hidrófilo). El balance hidrófobo / hidrófilo es preferiblemente de 2/2 hasta 4/1.

Tal como se ha expuesto aquí, los epítomos celulares de VEGF también comprenden péptidos que son antigénicos y equivalentes funcionales de los péptidos arriba descritos. Estos equivalentes funcionales tienen una secuencia alterada por sustitución, eliminación o adición de uno o más aminoácidos en la respectiva secuencia de referencia. Por ejemplo los residuos de cisteína se pueden eliminar o sustituir por otros aminoácidos, a fin de evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos tras la renaturalización.

Aunque es posible tener sustituciones no conservadoras de aminoácidos, se prefiere, exceptuando las sustituciones hechas para reemplazar la cisteína, que los cambios de aminoácidos sean conservadores, de tal manera, que el aminoácido sustituyente tenga propiedades estructurales o químicas análogas al correspondiente aminoácido de la secuencia de referencia. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras de aminoácidos implican el cambio de un aminoácido alifático o hidrófobo, como p.ej. alanina, valina, leucina e isoleucina, por otro análogo; la sustitución de un aminoácido hidroxilado, como p.ej. serina y treonina, por otro análogo; la sustitución de un residuo ácido, como p.ej. ácido glutámico o ácido aspártico, por otro análogo; la sustitución de un residuo amídico, como p.ej. asparagina y glutamina, por otro análogo; la sustitución de un residuo aromático, como p.ej. fenilalanina y tirosina, por otro análogo; la sustitución de un residuo básico, como p.ej. lisina, arginina e histidina, por otro análogo y la sustitución de un aminoácido corto, como p.ej. alanina, serina, treonina, metionina y glicina, por otro análogo.

Las eliminaciones y adiciones están localizadas preferiblemente junto al grupo amino terminal, junto al grupo carboxilo terminal, o ambos, de una de las secuencias mostradas anteriormente. Como resultado de las alteraciones el equivalente funcional del epítomo de VEGF tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a las correspondientes secuencias de referencia en al menos un 70%, preferiblemente en al menos un 80%, con mayor preferencia en al menos un 90%, sobre todo en al menos un 95%. Las secuencias que son al menos un 90% idénticas no tienen más de una alteración - es decir cualquier combinación de eliminaciones, adiciones o sustituciones - por 10 aminoácidos de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad se determina comparando la secuencia de aminoácidos de la variante con la secuencia de referencia, utilizando el proyecto MEGALIGN del programa DNA STAR.

Para los equivalentes funcionales de longitud superior a la correspondiente secuencia de referencia se prefiere que su secuencia sea al menos un 90% idéntica a la secuencia de referencia y a las secuencias que flanquean la secuencia de referencia en el VEGF natural o en la proteína de EG-VEGF. Además de ser un equivalente antigénico del epítomo del VEGF humano de origen natural, el equivalente funcional también es capaz de inducir anticuerpos que interrumpen la unión del VEGF humano o de la EG-VEGF al receptor de VEGF.

#### Preparación de epítomos y péptidos quiméricos colineales

Los epítomos de VEGF, los péptidos de VEGF quiméricos de la presente invención y los péptidos multivalentes de VEGF se sintetizan de modo preferente mediante el uso de sintetizadores de péptidos comercialmente disponibles. Se emplean preferiblemente los métodos químicos descritos en Kaumaya y otros, "DE NOVO" ENGINEERING OF PEPTIDE IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC DETERMINANTS AS POTENTIAL VACCINES [*Ingeniería de inmunógenos peptídicos y determinantes antigénicos como vacunas potenciales*], in Peptides, Design, Synthesis and Biological Activity (1994), pp 133-164, que se incorpora específicamente aquí como referencia.

Los epítomos y péptidos quiméricos de VEGF también se pueden producir mediante sistemas de traducción libres de células y moléculas de ARN derivadas de constructos de ADN que codifican el epítomo o péptido. Alternativamente los epítomos o péptidos quiméricos de VEGF se preparan transfectando células huésped con vectores de expresión que comprenden una secuencia de ADN codificadora del respectivo epítomo o péptido quimérico e induciendo luego

la expresión del polipéptido en las células huésped. Para la producción recombinante se introducen en las células huésped constructos recombinantes que comprenden una o más de las secuencias codificadoras del epítipo, del péptido quimérico o de una variante de ellos, empleando métodos convencionales tales como la transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección, microinyección, transfección catiónica mediada por lípidos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección.

Los epítipos y péptidos quiméricos de VEGF se pueden expresar en células huésped adecuadas tales como, por ejemplo, células de mamíferos, levaduras, bacterias, células de insectos u otro tipo de células bajo el control de promotores apropiados, empleando técnicas convencionales. Como huéspedes adecuados cabe mencionar, sin limitarse a ellas, *E. coli*, *P. pastoris*, células Cos y células 293 HEK. Después de transformar la cepa huésped idónea y cultivarla hasta una densidad celular apropiada, las células se recogen por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto crudo resultante se retiene para la posterior purificación del epítipo o del péptido quimérico.

Para aislar proteínas recombinantes de células huésped transformadas se pueden emplear métodos convencionales tales como el aislamiento mediante la extracción inicial del precipitado celular o del medio de cultivo de las células, seguido de precipitación salina y una o más etapas cromatográficas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico acuoso, cromatografías de exclusión de tamaños, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de afinidad. Para producir epítipos y péptidos quiméricos glicosilados es preferible utilizar técnicas recombinantes. Para producir epítipos y péptidos quiméricos glicosilados que contienen lo mismo es preferible utilizar células de mamífero como Cos-7 y Hep-G2 en las técnicas recombinantes.

Las variantes naturales de epítipos de VEGF arriba citadas también se pueden aislar, por ejemplo, cribando un ADNc apropiado o una biblioteca genómica con una secuencia de ADN que codifique el polipéptido.

#### Identificación de equivalentes funcionales del péptido de VEGF

Los equivalentes funcionales de los epítipos de VEGF arriba indicados pueden identificarse en general modificando la secuencia del epítipo y ensayando luego la capacidad del polipéptido resultante para estimular una respuesta inmunitaria, como p.ej. la producción de anticuerpos. Por ejemplo, estos ensayos se pueden realizar preparando un péptido quimérico que comprenda el polipéptido modificado y un epítipo promiscuo de células Th, inyectando el péptido quimérico en un animal de experimentación y buscando los anticuerpos. Dichos anticuerpos se pueden encontrar en varios fluidos corporales, incluyendo sueros y ascitis. Resumiendo, se extrae una muestra de fluido corporal de un animal de sangre caliente, tal como un humano, del cual se quiere determinar si lleva anticuerpos específicos de VEGF humano. El fluido corporal se incuba con la proteína humana VEGF o EGVEGF en condiciones y tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos entre el polipéptido y los anticuerpos específicos de la proteína y luego se analiza, preferiblemente mediante una técnica ELISA. En esta técnica se mide el cambio colorimétrico a 490 nm. Se prefieren los epítipos inductores de la producción de anticuerpos que presentan un título igual a 10.000 o superior para la proteína humana VEGF o EGVEGF. Tal como se usa aquí, un título de 10.000 se refiere a un valor de absorbancia de 0,2 por encima del fondo.

Los equivalentes funcionales del epítipo de VEGF también se identifican determinando si el péptido puede usarse para inducir anticuerpos que interrumpen la unión del VEGF humano al receptor de VEGF humano, tal como se describe más abajo en el ejemplo 1.

#### Determinación de las dosis óptimas para inhibir la angiogénesis o tratar el cáncer

También se pueden usar métodos *in vivo* para caracterizar los equivalentes funcionales de los presentes epítipos o para determinar las dosis óptimas de los péptidos quiméricos y multivalentes de VEGF. En un aspecto se puede usar un modelo de injerto heterólogo. En este modelo se crean tumores subcutáneos con una línea celular de cáncer ovárico (SKOV3), inyectando  $2 \times 10^6$  células tumorales mezcladas con matrigel en el flanco derecho de ratones BALB/c atímicos desnudos. Se deja que los tumores alcancen un tamaño de 150-200 mm<sup>3</sup> y después los ratones se distribuyen al azar para que reciban una inyección intraperitoneal de anticuerpos anti-VEGF o anti-EG-VEGF o de anticuerpos IgG no específicos (control) cada 3 días. Cada dos semanas se miden y se calculan los volúmenes de los tumores. La permeabilidad tumoral se valora mediante el ensayo de Miles, en el cual los ratones tratados y los de control reciben una inyección intracardiaca con solución de azul de Evans. Luego se sacrifican los animales, se fotografían, y se compara la proporción de permeabilidad entre los ratones tratados y los de control. Se extrae el tapón de matrigel y se examina la densidad vascular por inmunohistoquímica con CD31.

Luego se investiga *in vivo* la inmunización activa con las vacunas peptídicas de VEGF y EG-VEGF. La investigación anterior ha demostrado que la introducción de células de cáncer ovárico SKOV3 ( $10 \times 10^6$  células en 200 µl de PBS) en la cavidad peritoneal de ratones hembra inmunodeficientes (BALB/c nu/nu) conduce a un estado clínico idéntico al encontrado en mujeres con cáncer ovárico avanzado, incluyendo la formación de tumores que cubren la superficie de órganos intraperitoneales y el desarrollo de ascitis muy voluminosas a las 4 semanas de la inoculación [9]. La inyección subcutánea de células SKOV3 ( $10 \times 10^6$  células en 50 µl de PBS) produce probablemente un tumor medible a los 10 días de la inoculación. Para determinar la eficacia *in vivo* de la inmunización peptídica contra los

tumores ováricos se puede estudiar una combinación de ambas inyecciones - subcutánea e intraperitoneal - de células SKOV3.

Se vacunan grupos de 10 ratones con los epítomos de VEGF y EG-VEGF, tres veces, a intervalos de 3 semanas. Los títulos de los anticuerpos se controlan por ELISA. Tres semanas después de la tercera vacunación los ratones se exponen a células SKOV3. Los tumores subcutáneos se miden semanalmente con calibradores y sus volúmenes se estiman basándose en la suposición de que sean esféricos. Como el crecimiento de los tumores intraperitoneales no se puede medir directamente, los ratones se matan por sobredosis de anestesia aproximadamente 4 semanas después de la inoculación y se registra la localización y el tamaño del tumor, y la presencia de ascitis.

Otra prueba del efecto anti-angiogénico de los anticuerpos anti-VEGF educidos es la inhibición por el anticuerpo de la ovulación subsiguiente a la estimulación mediante gonadotropinas. Como la ovulación se regula a través de estímulos angiogénicos [18], se cree que la eficacia anti-angiogénica de los anticuerpos anti-péptido interrumpiría la ovulación. En este experimento se inmunizan grupos de ratas Sprague-Dawley hembra de 24 días de edad con anticuerpos anti-péptido contra VEGF, EG-VEGF, VEGF y EG-VEGF, o con anticuerpo no específico (control). A las cuatro de las inmunización las ratas se tratan con 20 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) y 24 horas más tarde con 20 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG), la secuencia hormonal estimulante que conduce a la ovulación. Después de 5 días se matan las ratas y se valora la eficacia inhibidora de la ovulación. Se cree que en las ratas tratadas con anticuerpos anti-péptido la ovulación se inhibirá eficientemente y en comparación con los animales de control se verá una disminución del peso ovárico, alteraciones del ciclo estrogénico, un menor crecimiento folicular y una menor inmunotinción con CD31.

La actividad *in vivo* de las vacunas peptídicas de VEGF también se puede valorar en un modelo murino transgénico que exprese VEGF humano bajo el control del promotor de insulina de rata (Rip1 VEGF-A) [20]. En este modelo se demostró que la sobreexpresión de VEGF aceleraba la aparición de angiogénesis tumoral y que se desarrollaban tumores espontáneos en un periodo de 10 semanas (ratón transgénico simple, RIP1Tag2) y 14 semanas (ratón transgénico doble, Rip1Tag2/Rip1 VEGF-A). En este estudio los ratones se inmunizan con epítomos de VEGF o EG-VEGF en un programa comprimido para coincidir con el desarrollo tumoral del ratón transgénico (inmunización inicial a las 5 semanas con refuerzo a las 7 y 9 semanas). Después se sacrifican los ratones y se calculan los volúmenes de los tumores. Los tumores se fijan embebidos en OCT, se congelan rápidamente y se analizan por tinción H&E. La densidad vascular se puede determinar por inmunotinción con CD31. Cabe esperar que la vacunación peptídica de VEGF contribuya a evitar o inhibir la formación de tumores en este modelo murino transgénico que sobreexpresa VEGF y que disminuyan las angiogénesis alternativas.

### Polinucleótidos

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los epítomos de VEGF y los péptidos quiméricos de la presente invención. Estos polinucleótidos también incluyen los que tienen secuencias capaces de hibridarse a las secuencias nucleótidas en condiciones rigurosas, preferiblemente muy rigurosas. Las condiciones de hibridación están basadas en la temperatura de fusión (Tf) del complejo de unión o sonda del ácido nucleico, tal como está descrito en Berger y Kimmel (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, vol 152, Academic Press. Tal como se emplea aquí, la expresión "condiciones rigurosas" se refiere a la "rigurosidad" en un margen aproximado de Tf -5 (5° por debajo de la temperatura de fusión de la sonda) hasta 20°C por debajo de Tf. Tal como se emplea aquí, la expresión condiciones "muy rigurosas" se refiere al uso de al menos un tampón SSC 0,2 x y al menos 65°C. Tal como se admite en el estado técnico, las condiciones rigurosas se pueden conseguir variando una serie de factores como la longitud y la naturaleza, es decir ADN o ARN, de la sonda; la longitud y la naturaleza de la secuencia diana, la concentración de las sales y de otros componentes tales como formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol en la solución de hibridación. Todos estos factores se pueden variar para crear unas condiciones de rigurosidad equivalentes a las condiciones arriba mencionadas.

Los polinucleótidos que comprenden secuencias codificadoras de un epítomo de VEGF o de un péptido quimérico de la presente invención se pueden sintetizar en su totalidad o en parte mediante métodos químicos o, preferiblemente, métodos recombinantes conocidos en el estado técnico. Los polinucleótidos que codifican un VEGF se pueden obtener cribando una biblioteca genómica o de ADNc con anticuerpos específicos, para identificar los clones que contienen el polinucleótido en cuestión.

Los polinucleótidos sirven para producir un epítomo de VEGF B, un péptido quimérico o un péptido multivalente. Por ejemplo, una molécula de ARN codificadora de un péptido quimérico se usa en sistemas de traducción libres de células para preparar dicho polipéptido. Como alternativa, una molécula de ADN codificadora de un epítomo de VEGF o de un péptido quimérico se introduce en un vector de expresión y se utiliza para transformar las células. Los vectores de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, p.ej. derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN fágicos, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágicos, ADN virales tales como virus vacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorrabia, báculovirus y retrovirus. La secuencia de ADN se introduce en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales.

Por tanto, la presente descripción también se refiere a constructos recombinantes que comprenden una o más de las presentes secuencias de polinucleótidos. Como constructos adecuados cabe citar, por ejemplo, vectores tales como un plásmido, fagémido o vector viral en los cuales se ha insertado una secuencia que codifica el epítipo de VEGF o el péptido quimérico. En el vector de expresión la secuencia de ADN que codifica el epítipo o el péptido quimérico se une operativamente a una secuencia de control de expresión, es decir a un promotor que dirige la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores cabe citar el promotor LTR o SV40, el promotor *E. coli* lac or trp, el promotor fago lambda PL y otros promotores conocidos que controlan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o en virus. El vector de expresión también contiene preferiblemente un sitio de unión de ribosoma para iniciar la traducción y un terminador de transcripción. Los vectores de expresión recombinantes también incluyen preferiblemente un origen de replicación y un marcador seleccionable, como por ejemplo el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* para permitir la selección de células transformadas, es decir las células que están expresando las secuencias de ADN heterólogo. La secuencia polinucleótida que codifica el epítipo de VEGF o el péptido quimérico se incorpora al vector en un marco con secuencias de inicio y final de traducción. Además el polinucleótido codifica preferiblemente una secuencia señalizadora que está unida operativamente al extremo amino del epítipo de VEGF o del péptido quimérico.

Los polinucleótidos que codifican el epítipo de VEGF o EG-VEGF o los péptidos quiméricos que comprenden tales epítopos se emplean para expresar péptidos recombinantes, utilizando técnicas bien conocidas del estado técnico. Dichas técnicas están descritas en Sambrook, J. y otros (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. y en Ausubel, F. M. y otros (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY. Los polinucleótidos que codifican el epítipo de VEGF o EG-VEGF o los péptidos quiméricos que comprenden tales epítopos también se usan para inmunizar animales.

### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que comprenden mezclas de epítopos de VEGF y/o de epítopos de EG-VEGF, péptidos quiméricos de VEGF o de EG-VEGF y péptidos multivalentes de VEGF o de EG-VEGF o los polinucleótidos que los codifican se formulan preferentemente para uso como composición farmacéutica (p.ej. una composición inmunógena o una vacuna). Estas composiciones llevan en general uno o más de los presentes epítopos de VEGF y/o de EG-VEGF, uno o más de los presentes péptidos quiméricos de VEGF y/o de EG-VEGF o uno o más de los presentes péptidos multivalentes de VEGF o de EG-VEGF o los polinucleótidos que los codifican, en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. A las dosis y concentraciones empleadas dichos vehículos no debe ser tóxicos para los receptores.

Además de los epítopos, de los péptidos multivalentes y de los péptidos quiméricos (que actúan como antígenos) o del polinucleótido que los codifica se incluyen preferiblemente en la composición farmacéutica otros componentes tales como un vehículo para la administración del antígeno y sustancias inmunoestimulantes para potenciar la inmunogenicidad de la proteína. Como ejemplos de vehículos para la administración de antígenos cabe mencionar sales de aluminio, emulsiones agua-en-aceite, vehículos oleosos biodegradables, emulsiones aceite-en-agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Para las vacunas que llevan el péptido quimérico un vehículo potencial de administración de antígenos es una microesfera biodegradable formada preferiblemente por poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA).

Aunque en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se puede usar cualquier vehículo adecuado conocido de los especialistas, el tipo de vehículo puede variar en función del modo de administración y de si se desea una liberación sustancial. Para una administración parenteral tal como la inyección subcutánea el vehículo comprende preferiblemente agua, suero fisiológico, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Como vehículo de las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden usar microesferas biodegradables (p.ej. galactida poliláctica). Opcionalmente la composición farmacéutica incluye un adyuvante.

Las mezclas de epítopos de VEGF, los péptidos quiméricos y multivalentes y los polinucleótidos que los codifican sirven para potenciar o educir una respuesta humoral en un sujeto o en una línea celular y preferiblemente una respuesta inmunitaria celular (p.ej. la producción de células T citolíticas específicas del antígeno). Tal como se emplea aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferiblemente un humano. Puede tratarse de un sujeto afectado de un cáncer como el ovárico o de un sujeto normal (es decir, sin enfermedad e infección detectables). La composición farmacéutica es especialmente útil para tratar mujeres que tienen antecedentes familiares de cáncer ovárico o que han sido diagnosticadas de este cáncer.

### Métodos de tratamiento

También se proporcionan métodos para tratar un cáncer relacionado con la sobreexpresión del VEGF. Por "tratamiento" se entiende la inhibición o la ralentización o el retardo del crecimiento del tumor. Dichos cánceres incluyen el ovárico. El método consiste en administrar a un sujeto una composición farmacéutica que lleve una mezcla de epítopos de VEGF y/o de EG-VEGF, uno o más péptidos quiméricos de VEGF o uno o más péptidos multivalentes de VEGF de la presente invención. Para administrar la composición farmacéutica es preferible utilizar inyecciones intramusculares a intervalos de tres semanas.

**También se proporcionan métodos** para inhibir la angiogénesis en los tejidos de crecimiento rápido de un sujeto. Los métodos consisten en administrar al sujeto una mezcla de epítomos de VEGF y/o de EG-VEGF de la presente invención, uno o más péptidos quiméricos de VEGF y/o de EG-VEGF de la presente invención, uno o más polipéptidos multivalentes de VEGF y/o de EG-VEGF de la presente invención o polinucleótidos que los codifiquen.

Los péptidos de la presente invención se refieren a los péptidos representativos arriba descritos y a variantes antigénicamente relacionadas de estos péptidos. Las “variantes antigénicamente relacionadas” de estos péptidos pueden ser variantes naturales o variantes modificadas de manera artificial que imitan inmunológicamente el epítomo de VEGF o de EG-VEGF arriba descrito. Estas variantes modificadas artificialmente se pueden preparar por síntesis química o por técnicas mutagénicas de ADN recombinante bien conocidas de los expertos en la materia (véase por ejemplo el capítulo 15 de Sambrook y otros, “Molecular Cloning a Laboratory Manual” (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Las variantes antigénicamente relacionadas de los péptidos deben tener una identidad mínima del 75% con uno de los epítomos de VEGF o de EG-VEGF anteriormente descritos (con mayor preferencia del 85% y sobre todo del 95%, como mínimo) y mantener la capacidad de imitar inmunológicamente el correspondiente sitio determinante de la antigenicidad de la proteína VEGF o EG-VEGF humana.

Para la presente invención, la expresión “imitar inmunológicamente el correspondiente sitio determinante de la antigenicidad de la proteína VEGF o EG-VEGF” se refiere a un (variante) péptido capaz de inducir anticuerpos que reconozcan específicamente una de las secuencias de epítomos naturales arriba descritas y/o en el caso de la proteína VEGF o EG-VEGF entera se refiere a un (variante) péptido capaz de ser reconocido por el mismo anticuerpo inmuno-específico que reconoce uno de los epítomos de VEGF o EG-VEGF anteriormente descritos. En la primera definición la variante del péptido debe ser capaz de inducir dichos anticuerpos por sí misma o junto con una molécula vehicular. En la segunda definición la variante debe ser capaz de ser reconocida por sí misma o junto con una molécula vehicular. Las variantes relacionadas antigénicamente pueden tener aminoácidos añadidos, insertados, sustituidos o eliminados. Se prefieren aquellas variantes que difieren de los referentes por sustituciones conservadoras de aminoácidos (preferiblemente una sola).

Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar de cualquier manera adecuada. Estos polipéptidos incluyen los producidos de modo recombinante, sintético o por combinación de estos métodos. Los medios para preparar dichos polipéptidos son bien conocidos en el estado técnico; no obstante se presentan modelos del método en la sección de los ejemplos.

### **Polinucleótidos de la presente invención**

**Los polinucleótidos de la presente invención definidos en la reivindicación 12 o 13** también se refieren a secuencias de ADN que pueden obtenerse de las secuencias de aminoácidos de los péptidos y polipéptidos según la presente invención, teniendo en cuenta la degeneración del uso de codones. Esto es bien sabido en el estado técnico, pues se trata de una información sobre el uso de codones en diferentes huéspedes de expresión, que ayuda a optimizar la expresión recombinante de los péptidos y polipéptidos de la presente invención.

También se proporcionan polinucleótidos complementarios de todos los polinucleótidos arriba descritos.

Cuando los polinucleótidos de la presente invención se usan para la producción recombinante de polipéptidos de la presente invención, el polinucleótido puede incluir la secuencia codificadora del polipéptido por sí sola o dentro de un marco de lectura con otras secuencias codificadoras tales como las que codifican una secuencia líder o secretora, una secuencia pre-, pro- o preproteica u otras porciones de péptidos de fusión. Por ejemplo, se puede codificar una secuencia marcadora que facilite la purificación del polipéptido fusionado. En algunas formas de ejecución preferidas de este aspecto de la presente invención la secuencia marcadora es un péptido de hexahistidina como el incluido en el vector pQE (Qiagen, Inc.), descrito en Gentz y otros, Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821-824, o es un marcador HA o glutatión-S-transferasa. el polinucleótido también puede contener secuencias 5' y 3' no codificadoras tales como secuencias transcritas no traducidas, señales de empalme y poliadenilación, sitios de unión de ribosoma y secuencias estabilizantes de ARNm.

### **Vectores, células huésped, expresión**

La presente invención también describe vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos según la presente invención y células huésped modificadas mediante ingeniería genética con los vectores descritos en la presente invención, así como a la producción de péptidos y polipéptidos de la presente invención por técnicas recombinantes. Para producir estas proteínas también se pueden emplear sistemas de traducción libres de células, utilizando ARN derivados de los constructos de ADN de la presente invención.

Para la producción recombinante, las células huésped se pueden manipular genéticamente a fin de incorporar sistemas de expresión (o porciones de ellos) de los polinucleótidos de la presente invención. La introducción de polinucleótidos en las células huésped se puede efectuar por métodos descritos en muchos manuales corrientes de laboratorio - por ejemplo Davis y otros, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986), y Sambrook y otros,

MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) – tales como la transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección catiónica mediada por lípidos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección.

Como ejemplos representativos de células huésped apropiadas cabe citar células bacterianas como meningococos, estreptococos, estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas como las de levaduras y *Aspergillus*; células de insectos como las de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y células del melanoma de Bowes; y células de vegetales.

Se puede usar una gran variedad de sistemas de expresión, incluyendo entre otros los sistemas cromosómicos, episómicos y los sistemas derivados de virus, p.ej. vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levaduras, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus tales como los báculo virus, papovavirus como SV40, virus vacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, como los cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan y también generan expresión. Para producir un polipéptido en un huésped se puede utilizar generalmente cualquier sistema o vector capaz de mantener, propagar o expresar polinucleótidos. La secuencia nucleótida apropiada se puede insertar en un sistema de expresión por cualquiera de varias técnicas bien conocidas y rutinarias, como por ejemplo las descritas en Sambrook y otros, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (arriba citado).

Para secretar la proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplasmático o en el entorno extracelular se pueden incorporar señales de secreción adecuadas al polipéptido deseado. Estas señales pueden ser endógenas respecto al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

#### **Purificación de péptidos/polipéptidos expresados de manera recombinante**

Los péptidos y polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatito y cromatografía de lecitina. Para la purificación se usa con mayor preferencia cromatografía líquida de alto rendimiento. Se pueden usar técnicas bien conocidas para replegar proteínas, a fin de regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y o la purificación.

Aunque la secuencia genética del polipéptido quimérico del VEGF en el vector se puede marcar con una secuencia de histidina que ayuda a purificar el polipéptido, ello no es un elemento esencial de la presente invención, ya que los polipéptidos sin el marcador de histidina todavía se pueden purificar mediante una de las técnicas arriba citadas.

#### **Anticuerpos**

Los péptidos y polipéptidos de la presente invención o las células que los expresan también se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos inmunoespecíficos del VEGF o de la EG-VEGF de tipo natural. El término "inmunoespecífico" significa que los anticuerpos tienen básicamente mayor afinidad por los péptidos o polipéptidos de la presente invención que por otros polipéptidos afines del estado técnico.

Los anticuerpos generados contra los péptidos o polipéptidos se pueden obtener administrando éstos a un animal, preferiblemente no humano, empleando protocolos rutinarios en la inmunización de un animal con un antígeno, recogiendo la sangre, aislando los anticuerpos del suero y utilizando los que reaccionan con el péptido. El suero o la fracción de IgG que contiene los anticuerpos se pueden usar para analizar la proteína. Para preparar anticuerpos monoclonales se puede emplear cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Como ejemplos cabe citar la técnica del hibridoma (Kohler, G. y Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros, Immunology Today (1983) 4:72) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole y otros, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Las técnicas para producir anticuerpos de cadena simple (patente U.S. nº 4,946,778) también se pueden adaptar para anticuerpos de cadena simple contra los péptidos o polipéptidos de la presente invención. Asimismo se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos arriba descritos se pueden utilizar para aislar o identificar clones que expresan el péptido, o para purificar los péptidos o polipéptidos de la presente invención por cromatografía de afinidad.

#### **Vacunas**

**Una composición de vacuna** contiene una cantidad inmunogénica de al menos un péptido o polipéptido de la presente invención. La composición también debería incluir preferiblemente un excipiente farmacéuticamente aceptable. La preparación de la vacuna está descrita de manera general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" [*El procedimiento de subunidad y adyuvante*] (eds. Powell M.F. & Newman MJ). (1995) Plenum Press Nueva York).

Además los péptidos y polipéptidos de la presente invención van preferiblemente coadyuvados en la formulación de vacuna según la presente invención. Como coadyuvantes adecuados cabe mencionar una sal de aluminio tal como el gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o el fosfato aluminico, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, derivados catiónicos o aniónicos de polisacáridos, o polifosfatenos. Otros coadyuvantes conocidos son oligonucleótidos que contienen CpG. Estos oligonucleótidos se caracterizan porque el dinucleótido CpG no está metilado. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y están descritos por ejemplo en la patente WO 96/02555.

Otros coadyuvantes preferidos son aquellos que inducen una respuesta inmunitaria, preferentemente del tipo TH1. Los niveles elevados de citocinas del tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células al antígeno dado, mientras que los niveles elevados de citocinas del tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales al antígeno. Los sistemas coadyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3DMPL), o una combinación de 3DMPL con una sal de aluminio. Los oligonucleótidos con CpG también inducen preferentemente una respuesta TH1. Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A con un derivado de saponina, en particular la combinación de QS21 y 313- MPL, tal como revela la patente WO 94/00153, o una combinación menos reactogénica en que el QS21 se mitiga con colesterol, tal como revela la patente WO 96/33739. En la patente WO 95/17210 se describe una formulación preferida de coadyuvante, especialmente potente, que comprende QS21 3D-MPL y tocoferol en una emulsión del tipo aceite en agua.

**Un método para inducir** una respuesta inmunológica en un mamífero, que consiste en inocularle un péptido o polipéptido de la presente invención que sea adecuado para producir anticuerpos capaces de inhibir la angiogénesis o el crecimiento de los tumores, entre otras cosas. Otro método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero consiste en suministrar un péptido o polipéptido de la presente invención mediante un vector que dirige la expresión de un polinucleótido de la presente invención *in vivo*, a fin de inducir una respuesta inmunológica que produzca anticuerpos para proteger dicho animal de enfermedades.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una formulación (composición) inmunológica/vacuna, que al introducirla en un huésped mamífero induce una respuesta inmunológica al péptido VEGF o EG-VEGF en este mamífero, de modo que la composición comprende un polinucleótido codificador de un epítipo de VEGF o de EG-VEGF o el propio epítipo de VEGF o EG-VEGF. Además la formulación de la vacuna puede comprender un vehículo adecuado. La composición de la vacuna de VEGF se administra preferiblemente por vía oral, intranasal o parenteral (incluyendo la inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, transdérmica). Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes suspensores o espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en dosis unitarias o en recipientes multidosis, por ejemplo en ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar liofilizadas, de manera que solo requieran la adición del líquido estéril inmediatamente antes del uso. La formulación de la vacuna también puede incluir coadyuvantes, tal como se ha descrito anteriormente. La dosis dependerá de la actividad específica de la vacuna y se puede establecer fácilmente mediante experimentación rutinaria.

Otros aspectos adicionales se refieren a una formulación inmunológica/vacuna que comprende el polinucleótido de la presente invención. Estas técnicas son conocidas del estado técnico; véase por ejemplo Wolff y otros, Science, (1990) 247: 1465-8.

### Ejemplos

A continuación se describen ejemplos de métodos, aunque en la práctica o ensayo de los péptidos, composiciones y métodos de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos.

Los materiales, métodos y ejemplos solo son ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

### EJEMPLO 1

#### Resumen

Los epítopos de VEGF se identificaron mediante un análisis asistido por ordenador, con el empleo de correlatos específicos de antigenicidad. Estos epítopos se sintetizaron, purificaron y combinaron con la proteína de fusión del

virus del sarampión (MVF), un epítipo de células T. Los anticuerpos del péptido de VEGF se educieron en ratones y conejos tras la vacunación primaria y la de refuerzo. La especificidad de los anticuerpos se determinó por ELISA y Western blot. La función de los anticuerpos del péptido de VEGF se evaluó mediante el ensayo de interacción de Fluorokine® con el receptor de VEGF. La invasión vascular, un marcador de angiogénesis, se determinó inyectando a ratones C57BL/6 por vía subcutánea Matrigel® (una membrana basal derivada de sarcoma de ratón) incubado con y sin proteína VEGF humana recombinante en presencia o ausencia de anticuerpos del péptido de VEGF y de anticuerpos monoclonales de VEGF murino. La angiogénesis en Matrigel® se determinó por tinción de Hoechst y cuantitativamente contando los vasos sanguíneos que invadieron la Matrigel®. Las diferencias de angiogénesis relativa se compararon mediante la prueba t de Student.

Los péptidos de VEGF de la región antigénica predicha educieron anticuerpos de título elevado en ratones y conejos (1:500.000 a 3y+4). Mediante ELISA y análisis Western blot se demostró que estos anticuerpos eran específicos de rhVEGF. Los anticuerpos del péptido de VEGF produjeron *in vitro* una interrupción significativa de la interacción normal entre el VEGF y el receptor de VEGF, en comparación con el control, mediante el ensayo Fluorokine®. El ensayo de invasión en Matrigel® reveló *in vivo* que los anticuerpos del péptido de VEGF producían una profunda disminución cuantitativa de la invasión de vasos sanguíneos en la matriz, en comparación con el control (invasión vascular de VEGF solo = 118,2 frente a los anticuerpos de los péptidos de VEGF + VEGF = 26,4,  $P = 0,005$ ).

Conclusión: los anticuerpos del péptido de VEGF educidos de las regiones antigénicas del VEGF son inmunógenos, específicos y antiangiogénicos. Por tanto se espera que la inmunización activa con una vacuna de péptido de VEGF sea un tratamiento biológicamente importante para las mujeres con cáncer ovárico epitelial.

## Materiales y métodos

### Selección de epítipos de VEGF

La selección de posibles epítipos celulares B de VEGF se realizó mediante un análisis asistido por ordenador, con el empleo de correlatos específicos de antigenicidad (Peptide Companion, PeptiSearch), utilizando los perfiles de flexibilidad y movilidad de la cadena, la hidropatía, los índices de protrusión y la antigenicidad [Kaumaya 1994]. A las secuencias se les asignó una puntuación de 1 a 6 basada en los respectivos valores de sus índices y se clasificaron según ella. Los epítipos con la mejor puntuación se clasificaron de nuevo según la correlación con sus atributos estructurales secundarios, prefiriendo una secuencia anfífilica alfa-helicoidal o una región bucle de giro beta antes que un fragmento de espiral aleatoria. Por último se tuvo en cuenta la secuencia individual de aminoácidos. También se consideraron los pares electrostáticos iónicos y la interacción hélice-dipolo en el segmento helicoidal (balance hidrófobo / hidrófilo). Las secuencias que obtuvieron las mayores puntuaciones fueron seleccionadas para seguir investigándolas. Nuestro grupo ha evaluado una serie de péptidos antigénicos que contienen epítipos de células T derivados de fuentes no humanas, identificados como "promiscuos" por su reconocimiento relacionado con muchas moléculas del MHC y su capacidad de educir respuestas de TH [Kaumaya 1993]. La secuencia 288-302 de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) se escogió como epítipo promiscuo para superar el reto de la tolerancia y del polimorfismo del MHC. El epítipo de MVF se juntó linealmente con el epítipo de VEGF mediante un conector de cuatro restos (GPSL) en un sintetizador de péptidos. Los restos de glicina y prolina del conector potencian un giro beta en el oligopéptido, mientras que la serina favorece los enlaces de hidrógeno con los grupos NH libres del esqueleto. La naturaleza flexible del conector permite el plegamiento independiente de los epítipos de las células T y B. Los péptidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa para asegurar una pureza > 95%. Los péptidos se identificaron mediante desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador del tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

### Vacunación y educación de anticuerpos del péptido de VEGF

Para generar anticuerpos del VEGF se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) y ratones BALB/c (Harlan, Indianapolis, IN) por vía subcutánea en varios sitios con un total de 1 mg de cada péptido emulsionado en un vehículo de Squaline/Arlacel que contenía nor-MDP (N-acetil-glucosamin-3-il-acetil L-alanil-D-isoglutamina). Tras la inmunización primaria (1y) se pusieron inyecciones de refuerzo a las 3 semanas (inmunización secundaria, 2y) y a las 6 semanas (inmunización terciaria, 3y). Los sueros de conejo y de ratón se recogieron semanalmente y el complemento se inactivó calentando a 56°C. Los sueros de título alto se purificaron en una columna de proteína A/G-agarosa (Pierce, Rockford, IL) y los anticuerpos eluidos se concentraron e intercambiaron en PBS, utilizando unidades de filtración con centrifuga de Mr 100.000 como límite (Millipore, Bedford, MA). La concentración de anticuerpos se cuantificó por ELISA.

### Caracterización de los anticuerpos del péptido de VEGF

Se efectuaron análisis Western blot para determinar si los anticuerpos del péptido de VEGF reconocían la proteína VEGF. Las proteínas, incluyendo el rhVEGF, se separaron en SDS-PAGE al 15%, se transfirieron a nitrocelulosa y se hibridaron con anticuerpos del péptido de VEGF o con un anticuerpo monoclonal murino del VEGF (Ab-4, Neoprobe, Inc., Fremont, CA). La transferencia de las proteínas se controló con patrones de peso molecular teñidos

previamente. Las bandas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL), utilizando inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa de rábano picante.

5 En un intento de determinar el efecto de nuestros anticuerpos del péptido de VEGF en la interacción del VEGF con el receptor de VEGF utilizamos el ensayo de Fluorokine® (R&D Systems, Minneapolis, MN). En resumen,  $5 \times 10^5$  células HUVEC se lavaron e incubaron con el rhVEGF biotinilado, que a su vez se une a las células mediante el VEGFR. Luego las células se incuban directamente con avidina-fluoresceína, la cual se fija al VEGF biotinilado unido al receptor. La citocina libre participa en una reacción de amplificación con la citocina fijada, que produce una señal intensificada sin comprometer la especificidad. Las células que expresan el VEGFR se tiñen de forma fluorescente con una intensidad de tinción proporcional a la densidad de los receptores. La densidad relativa de los receptores se determina luego por citometría de flujo. Mediante este experimento normalizamos inicialmente el componente de citometría de flujo del ensayo, en el cual se identificaron distintas poblaciones celulares mediante el uso de los controles positivos (rhVEGF) y negativos (sin estimulación) suministrados, y también con un anticuerpo inhibidor proporcionado con el kit. Tras la normalización se usaron varias concentraciones de anticuerpos de ratón o conejo del péptido de VEGF en lugar del anticuerpo inhibidor suministrado, a fin de determinar la densidad proporcional de VEGFR.

#### *Determinación de las propiedades anti-angiogénicas de los anticuerpos del péptido de VEGF*

20 La invasión de vasos sanguíneos se analizó en un modelo murino, utilizando Matrigel®, una matriz solubilizada de membrana basal extraída del sarcoma murino EHS [Passiniti]. La Matrigel® es líquida a 4°C, pero también polimeriza a 4°C, lo cual permite retirarla de un animal huésped con fines analíticos. Se inyectaron grupos de 5 ratones hembra C57BL/6 (Harlan, Indianapolis, IN) por vía subcutánea con un volumen total de 500 µl, incluyendo Matrigel®, varias concentraciones de rhVEGF y varias concentraciones de anticuerpos (anticuerpo monoclonal del VEGF (MAB293, R&D Systems, Minneapolis, MN) o anticuerpos del péptido de VEGF). A los 10 días se sacrificaron los ratones. Los tapones de Matrigel® se quitaron, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina y con el colorante nuclear Hoechst 33342. La invasión en el tapón se comprobó con un microscopio fluorescente invertido a 40x aumentos. Los vasos sanguíneos en la periferia del tapón se identificaron y contaron circunferencialmente alrededor del mismo y también a ciegas mediante análisis asistido por ordenador. Las comparaciones estadísticas entre grupos se hicieron con la prueba t de Student.

#### **Resultados**

35 El análisis de los posibles epítomos de células B del VEGF se empleó para seleccionar los residuos 127-144 (KCECRPKKDRARQENPCG), el cual tiene correlación con una estructura secundaria de giro-hélice-giro como potencial inmunógeno y antigénico. Este epítomo se unió linealmente con el epítomo promiscuo de células T de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) mediante el conector de cuatro restos GPSL en un sintetizador de péptidos. Los péptidos se purificaron y su identidad fue confirmada por MALDITOF. Los conejos y los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con el inmunógeno de MVF-VEGF y los sueros obtenidos se purificaron. Los títulos elevados de anticuerpos del péptido de VEGF (1:500.000 a las 4 semanas de la inmunización terciaria, 3y+4) se identificaron por ELISA tal como se muestra en la figura 1 para los conejos.

45 Por ELISA (figura 2) y Western blot (figura 3A) se demostró que los anticuerpos del péptido de VEGF reconocen la proteína rhVEGF. Como control positivo en el Western blot se usó Ab-4, un anticuerpo monoclonal contra el VEGF, y el homodímero esperado de la proteína rhVEGF se confirmó a 42kDa (figura 3B).

50 Tras la demostración de las propiedades antigénicas e inmunogénicas de los anticuerpos del péptido de VEGF se evaluaron sus propiedades funcionales. Se demostró que estos anticuerpos del péptido de VEGF interrumpen de manera significativa la interacción normal entre el VEGF y el receptor de VEGF (VEGFR), tal como se determina en el ensayo de Fluorokine® (figura 4). En este experimento la adición de los anticuerpos del péptido de VEGF produce la fijación del VEGF y por lo tanto un descenso de la interacción normal VEGF-VEGFR.

55 Continuamos determinando si estos anticuerpos del péptido de VEGF tenían propiedades anti-angiogénicas como consecuencia de la inhibición de la función del VEGF. En comparación con los tapones subcutáneos de Matrigel® incubados con rhVEGF antes de inyectarlos en los ratones C57BL/6, en los tapones incubados simultáneamente con anticuerpos del péptido de rhVEGF y VEGF se observó un descenso importante de la angiogénesis en la Matrigel®  $P= 0,005$ , figuras 5 y 6). Las características anti-angiogénicas de los anticuerpos del péptido de VEGF fueron equivalentes a las del anticuerpo monoclonal de VEGF utilizado como control positivo ( $P = NS$  al comparar los anticuerpos del péptido de VEGF con los anticuerpos monoclonales de VEGF, datos no representados).

#### **Discusión**

65 Demostramos que mediante el diseño racional de péptidos, utilizando epítomos de células B del VEGF, se educen anticuerpos específicos de VEGF. Estos anticuerpos reconocen la proteína completa a partir de la cual se ha diseñado el péptido e inhiben la función proteica esperada. La inmunoterapia para el tratamiento del cáncer ha evolucionado mucho durante las pasadas décadas. Anteriormente los pacientes se trataban con estimulantes

5 inmunitarios no específicos, mientras que la terapia actual se dirige a la identificación de antígenos específicos asociados al tumor (TAAs) como dianas de la inmunoterapia. La inmunoterapia tumoral específica se clasifica en pasiva, donde los anticuerpos se envían directamente a las células tumorales, y activa, donde se usa la vacunación con péptidos, células tumorales, lisados de células tumorales, carbohidratos, constructos genéticos y anticuerpos anti-idiotipo que imitan los TAAs en un huésped que organiza una respuesta inmunitaria específica.

10 Históricamente la inmunización activa con péptidos ha tenido una eficacia limitada a causa de su inmunogenicidad restringida. Los anticuerpos educidos en animales por inmunización con péptidos sintéticos han demostrado en general poca afinidad por la proteína natural, en parte porque los sitios de reconocimiento del anticuerpo suelen ser conformacionales y los inmunógenos peptídicos carecen de estructura definida en solución. La acción estimulante genéticamente restringida de los péptidos también era un gran obstáculo en el desarrollo de métodos de vacunación para una población humana exógena [Dulofeut]. La conjugación covalente de péptidos epítomos de células B con moléculas grandes de vehículo se utilizó a veces para abordar este problema, pero a menudo dio como resultado hipersensibilidad, cambios conformacionales, aparición de estructuras indefinidas, pérdida de epítomos, presentación inapropiada de epítomos y variabilidad de conjugación entre lotes. Hemos abordado varios de estos problemas en nuestro método racional de diseño de vacunas peptídicas de subunidades [Dakappagari].

20 Nuestra estrategia consistió en el diseño nuevo de determinantes topográficos centrados en preservar la secuencia proteica natural y facilitar el plegamiento del péptido hacia una conformación estable que imitara la estructura de la proteína natural [Kobs, Kaumaya 1990]. Hemos demostrado la eficacia de incorporar a estos constructos epítomos promiscuos de linfocitos T colaboradores, derivados de moléculas no humanas, a fin de superar el polimorfismo genético del MHC humano [Kaumaya 1993]. Nuestro trabajo anterior en varios sistemas de modelos ha demostrado que con este método se pueden educir anticuerpos de título elevado capaces de reconocer la proteína natural en una población exógena, lo cual se ha confirmado en esta investigación de epítomos de VEGF.

25 Cabe destacar que las vacunas peptídicas de subunidades pueden dirigir respuestas inmunitarias a los epítomos biológicamente activos. La necesidad de vacunas basadas en epítomos proviene del hecho de que la tolerancia a autoantígenos tales como el VEGF puede limitar una respuesta inmunitaria funcional a las vacunas basadas en la proteína completa, debido a la activación de células T supresoras que mantienen la tolerancia a antígenos huésped o a mecanismos reguladores alternos [Sakaguchi]. La capacidad de centrar estrechamente la respuesta inmunitaria es de particular importancia para el VEGF, donde la interacción del anticuerpo con los sitios específicos puede inhibir el crecimiento. Al contrario que en la terapia pasiva se puede asegurar a bajo coste la continua disponibilidad de anticuerpos dirigidos al tumor.

35 Investigadores anteriores han desarrollado estrategias similares de terapia anti-VEGF del cáncer. El interés del VEGF como antígeno modelo para explorar la terapia inmunogénica se ha demostrado mediante la construcción de un ADN plásmido que codifica VEGF homólogo de *Xenopus* [Wei]. Este grupo comprobó que la terapia tumoral inmunogénica mediante esta vacuna producía el desarrollo de anticuerpos específicos de VEGF que eran anti-angiogénicos e inhibían la formación de tumores. Cabe destacar que el tratamiento de ratones con el inmunógeno no produjo efectos tóxicos importantes. En otro trabajo se ha demostrado que la vacunación con células dendríticas transfectadas con ARNm de VEGF induce respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL), interrumpe la angiogénesis y tiene eficacia antitumoral sin morbosidad o mortalidad significativa *in vivo* en un modelo murino [Nair]. Por tanto los trabajos anteriores han demostrado que es factible la inmunización activa con VEGF como TAA.

45 Esta investigación está limitada por el hecho de que el antígeno elegido para el estudio, el VEGF, se expresa de manera ubicua en estados normales y patológicos, y por tanto su inhibición puede tener consecuencias biológicas potencialmente graves. Aunque el desarrollo fetal está controlado fuertemente por la angiogénesis, en el huésped adulto la angiogénesis solo controla la reproducción, la curación de heridas y el cáncer. Por consiguiente creemos que el control relativo de la sobreexpresión del VEGF en los casos de malignidad puede proporcionar una tasa terapéutica aceptable en el tratamiento de los tumores sólidos, lo cual está apoyado por la investigación previa de otros métodos de disminución del VEGF (p.ej. mediante vacunas de ADN o inhibición del VEGFR) que no tuvieron una toxicidad importante.

50 La mayoría de mujeres con cáncer ovárico son diagnosticadas con la enfermedad avanzada y a pesar de que la mayor parte obtiene una respuesta clínica completa tras la inducción quimioterapéutica, el 80% recae y sucumbe a su enfermedad. Este escenario sugiere que tras la terapia inicial queda una enfermedad microscópica residual que es la responsable de la recurrencia. Por este motivo un enfoque actual de la investigación clínica del tratamiento del cáncer ovárico consiste en tener en cuenta el mantenimiento de la quimioterapia. En este caso se ha demostrado que los pacientes con una respuesta clínica completa tras el tratamiento inicial tienen una mejor supervivencia sin enfermedad, si se prolonga inmediatamente dicho tratamiento [Markman].

60 Es interesante que la investigación del papel de la inmunización activa con el anticuerpo anti-idiotipo ACA125 (que imita el antígeno CA125 asociado al tumor en el cáncer ovárico) como quimioterapia de mantenimiento en el cáncer ovárico ha demostrado un impacto positivo en la supervivencia general [Wagner]. Por tanto la inmunización activa como quimioterapia de mantenimiento para evitar la recurrencia sintomática del cáncer ovárico es una idea atractiva. Se ha demostrado que la angiogénesis influye en el crecimiento del cáncer de manera variable según las fases de la

proliferación maligna. De manera importante, se piensa que los estados neoplásicos premalignos y los pequeños tumores malignos crecen por influencia directa de mitógenos endoteliales tales como el VEGF, mientras que los tumores malignos más grandes pueden crecer y metastatizar independientemente de los factores angiogénicos [Hanahan and Folkman]. La idea de que los factores angiogénicos controlan el crecimiento temprano del tumor ha sido aplicada al tratamiento clínico del cáncer ovárico. Los esfuerzos de la investigación actual se dirigen al estudio de agentes quimioterapéuticos capaces de actuar como citostáticos anti-angiogénicos. Estos compuestos, como por ejemplo el tamoxifeno y la talidomida, están siendo evaluados en mujeres con cáncer ovárico asintomático de recurrencia temprana, para comprobar si la terapia anti-angiogénica puede prevenir un desarrollo clínicamente significativo de la enfermedad sintomática. En tal caso la terapia anti-angiogénica mediante la inmunización activa con epítomos de VEGF serviría como terapia de mantenimiento racional que tendría un impacto importante en el tratamiento del cáncer ovárico.

A partir de esta investigación demostramos que el diseño racional de vacunas peptídicas contra el VEGF educa anticuerpos de título alto contra el péptido de VEGF, que son específicos y anti-angiogénicos.

#### Documentos citados para el ejemplo 1

1. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin 2003; 53:5-26.
2. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer [*Ciclofosfamida y cisplatina en comparación con paclitaxel y cisplatina para pacientes con cáncer ovárico en fase III y en fase IV*]. N Engl J Med 1996; 334:1-6.
3. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [*El factor de crecimiento endotelial vascular es un mitógeno angiogénico secretado*]. Science 1989; 246:1306-9.
4. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries [*Expresión genética del factor de permeabilidad vascular en ovarios humanos normales y neoplásicos*]. Cancer Res 1994; 54:276-80.
5. Boockch CA, Chamock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors fit and KDR in ovarian carcinoma [*Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y sus receptores fit y KDR en el carcinoma ovárico*]. J Natl Cancer Inst 1995; 87:506-16.
6. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma [*Angiogénesis tumoral en el carcinoma ovárico en estado avanzado*]. Am J Pathol 1995; 147:33-41.
7. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian cancer [*Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en el cáncer ovárico en fase temprana*]. Cancer 1997; 80:98-106.
8. Tempfer C, Obermair A, Hefler L, Haeusler G, Gitsch G, Kainz C. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in ovarian cancer [*Concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular en el cáncer ovárico*]. Obstet Gynecol 1998; 92:360-3.
9. Kim KJ, Li B, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo [*La inhibición de la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular suprime el crecimiento tumoral in vivo*]. Nature. 1993; 362:841-4.
10. Gordon MS, Margloin K, Talpaz M, Sledge GW Jr, Holmgren E, Benjamin R, Stalter S, Shak S, Adelman D. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer [*Estudio de seguridad y farmacocinético en fase I de recombinante humano anti-factor de crecimiento endotelial vascular en pacientes con cáncer avanzado*]. J Clin Oncol 2001; 19:843-50.
11. Margolin M, Gordon MS, Holmgren E, Gaudreault J, Fyfe G, Adelman B, Stalter S, Breed J. Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: Pharmacologic and long-term safety data [*Ensayo en fase Ib de anticuerpo monoclonal humanizado recombinante por vía intravenosa contra el factor de crecimiento endotelial vascular en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer avanzado: datos farmacológicos y de seguridad a largo plazo*]. J Clin Oncol 2001; 19:851-6.
12. Dakappagari N, Douglas DB, Triozzi PL, Stevens VC, Kaumaya PTP. Prevention of mammary tumors with a chimeric HER-2 B-cell epitope peptide vaccine [*Prevención de tumores mamarios con una vacuna peptídica de epítomos de células B del HER-2 quimérico*]. Cancer Res 2000; 60; 3782-9.
13. Peoples GE, Goedegebuure PS, Smith R, Linehan DC, Yoshino I, Eberlein TJ. Breast and ovarian cancer specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide [*Los linfocitos T citotóxicos específicos del cáncer mamario y ovárico reconocen el mismo péptido derivado de HER2/neu*]. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:432-6.
14. Kaumaya PTP, Kobs-Conrad S, DiGeorge AM, Stevens V. De novo engineering of protein immunogenic and antigenic determinants [*Ingeniería nueva de inmunogénicos proteicos y determinantes antigénicos*]. Peptides 1994; 9:1 33-64.

15. Kaumaya PT, Kobs-Conrad S, Seo YH, Lee H, Van Buskirk AM, Feng N, Sheridan JF, Stevens V. Peptide vaccines incorporating a "promiscuous" T-cell epitope bypass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity [*Las vacunas peptídicas que incluyen un epítipo "promiscuo" de células T evitan ciertas respuestas inmunitarias restringidas por haplotipos y aportan una inmunogenicidad de amplio espectro*]. *J Mol Recognit* 1993; 6:81-94.
- 5 16. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor [*Método cuantitativo sencillo para valorar la angiogénesis y los agentes angiogénicos mediante el uso de membrana basal reconstituida, heparina y factor de crecimiento de fibroblastos*]. *Lab Invest* 1992; 67:519-28.
- 10 17. Deulofeut H, Iglesias A, Mikael N, Bing DH, Awdeh Z, Yunis J, Marcus-Bagley D, Kruskall MS, Alper CA, Yunis EJ. Cellular recognition and HLA restriction of a midsequence HBsAg peptide in hepatitis B vaccinated individuals [*Reconocimiento celular y restricción HLA de una péptido HBsAg en una secuencia en sujetos vacunados contra la hepatitis B*]. *Mol Immunol* 1993; 30:941-948.
- 15 18. Kobs-Conrad S, Lee H, DiGeorge AM, Kaumaya PT. Engineered topographic determinants with  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha\beta$ , and  $\beta\alpha\beta\alpha$  topologies show high affinity binding to native protein antigen (lactate dehydrogenase-C4) [*Determinantes producidos por ingeniería genética con topologías  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha\beta$  y  $\beta\alpha\beta\alpha$  que muestran una gran afinidad de fijación al antígeno proteico natural (lactato deshidrogenasa-C4)*]. *J Biol Chem* 1993; 268:25285-25295.
- 20 19. Kaumaya PT, Berndt KD, Heidom DB, Trehwella J, Kezdy FJ, Goldberg E. Synthesis and biophysical characterization of engineered topographic immunogenic determinants with  $\alpha\alpha$  topology [*Síntesis e identificación biofísica de determinantes inmunogénicos topográficos con topología  $\alpha\alpha$  producidos por ingeniería genética*]. *Biochemistry* 1990; 29:13-23.
- 25 20. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance [*Células T reguladoras: controladores clave de la auto-tolerancia inmunológica*]. *Cell* 2000; 101:455-8.
- 30 21. Wei YQ, Huang MJ, Yang L, Zhao X, Tian L, Lu Y, Shu JM, Lu CJ, Niu T, Kang B, Mao YQ, Liu F, Wen YJ, Lei S, Luo F, Zhou LQ, Peng F, Jiang Y, Liu JY, Zhou H, Wang QR, He QM, Xiao F, Lou YY, Xie XJ, Li Q, Wu Y, Ding ZY, Hu B, Hu M, Zhang W. Immunogene therapy of tumors with vaccine based on *Xenopus* homologous vascular endothelial growth factor as a model antigen [*Terapia inmunogénica de tumores con vacuna basada en el factor de crecimiento endotelial vascular homólogo de Xenopus como antígeno modelo*]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:11545-50.
- 35 22. Nair S, Boczkowski D, Moeller B, Dewhirst M, Vieweg J, Gilboa E. Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy [*Sinergia entre la inmunoterapia tumoral y la terapia anti-angiogénica*]. *Blood* 2003; 102:964-71.
- 40 23. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium [*Identificación de un mitógeno angiogénico selectivo del endotelio de glándulas endocrinas*]. *Nature*. 2001; 412:877-84.
- 45 24. Markman M, Liu PY, Wilczynski S, Monk B, Copeland LJ, Alvarez RD, Jiang C, Alberts D; Southwest Oncology Group; Gynecologic Oncology Group. Phase III randomized trial of 12 versus 3 months of maintenance paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer after complete response to platinum and paclitaxel-based chemotherapy: a Southwest Oncology Group and Gynecologic Oncology Group trial [*Ensayo aleatorizado en fase III de 12 frente a 3 meses de mantenimiento de paclitaxel en pacientes con cáncer ovárico avanzado tras una respuesta completa a una quimioterapia basada en platino y paclitaxel: ensayo del grupo de oncología Southwest y del grupo de oncología ginecológica*]. *J Clin Oncol* 2003; 21:2460-5.
- 50 25. Wagner U, Kohler S, Reinartz S, Giffels P, Huober J, Renke K, Schlebusch H, Biersack HJ, Mobus V, Kreienberg R, Bauknecht T, Krebs D, Wallwiener D. Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotype antibody ACA125: immune responses and survival in palliative treatment [*Consolidación inmunológica de recurrencias de carcinoma ovárico con anticuerpo monoclonal anti-idiotipo ACA125: respuestas inmunitarias y supervivencia al tratamiento paliativo*]. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1154-1162.
- 55 26. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [*Modelos y mecanismos emergentes del cambio angiogénico durante la génesis tumoral*]. *Cell* 1996; 86:353-64.

## EJEMPLO 2

### Selección de epítomos de VEGF y EG-VEGF

Los posibles epítomos de células B del VEGF y de la EG-VEGF se han seleccionado mediante un análisis asistido por ordenador, con el uso de correlatos específicos de antigenicidad, utilizando los perfiles de flexibilidad y movilidad de la cadena, la hidropatía, los índices de protrusión y la antigenicidad. A las secuencias se les asignó una puntuación de 1 hasta 6 basada en los respectivos valores de sus índices y se clasificaron según ella. Los epítomos con la mejor puntuación se clasificaron de nuevo según la correlación con sus atributos estructurales secundarios, prefiriéndose una secuencia anfifílica alfa-helicoidal o una región bucle de giro beta antes que fragmentos de espiral aleatoria. Por último se tuvo en cuenta la secuencia individual de aminoácidos. También se consideraron los pares electrostáticos iónicos y la interacción hélice-dipolo en el segmento helicoidal (balance hidrófobo / hidrófilo). Las secuencias que obtuvieron las mayores puntuaciones fueron seleccionadas para seguir investigándolas. La tabla 1

presenta las secuencias y la estructura secundaria de los epítomos de VEGF y de EG-VEGF seleccionados para la investigación.

Tabla 1: secuencia de los mejores candidatos para la síntesis de inmunógenos

Estructura del inmunógeno	Restos	Secuencia de aminoácidos	Secundaria
VEGF	127-144	KCECRPKKDRARQENPCG	Giro-Hélice-Giro
EG-VEGF	50-67	CTPLGREGEECHPGSHKV	Giro-Hélice-Giro

Nuestro grupo ha evaluado una serie de péptidos antigénicos que contienen epítomos de células T derivados de fuentes no humanas y que han sido identificados como "promiscuos" por su reconocimiento en asociación con muchas moléculas del MHC y por su capacidad de educir respuestas de TH. La secuencia 288-302 de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) fue escogida como el epítomo promiscuo para superar el reto de la tolerancia y del polimorfismo del MHC. El epítomo de MVF se juntó linealmente con el epítomo de VEGF o de EG-VEGF mediante un conector de cuatro restos (GPSL) en un sintetizador de péptidos (tabla 3). Los restos de glicina y prolina del conector potencian un giro beta en el oligopéptido, mientras que la serina favorece los enlaces de hidrógeno con los grupos NH libres del esqueleto. La naturaleza flexible del conector permite el plegamiento independiente de los epítomos de las células T y B. Los péptidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa para asegurar una pureza > 95%. Los péptidos se identificaron por espectrometría de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo.

Para generar anticuerpos anti-VEGF y anti-EG-VEGF se inmunizaron conejos por vía subcutánea en varios sitios con un total de 1 mg de cada péptido emulsionado en un vehículo de Squaline/Arlacel que contenía nor-MDP (N-acetil-glucosamin-3-il-acetil L-alanil-D-isoglutamina). Tras la inmunización primaria se dieron inyecciones de refuerzo a las 3 semanas y 6 semanas. Los sueros de conejo se recogieron semanalmente, se purificaron y se cuantificaron por ELISA (figura 1).

Después de purificar los anticuerpos anti-VEGF y anti-EG-VEGF continuamos determinando si los anticuerpos educidos tenían propiedades anti-angiogénicas. Los datos previos demuestran que la función ovárica es regulada estrechamente por estímulos angiogénicos y se ha visto que el VEGF es importante en el reclutamiento y selección de folículos. Por consiguiente supusimos que si los anticuerpos actuaban como moléculas anti-angiogénicas, con la neutralización del VEGF cabría esperar la inhibición de la selección y crecimiento de los folículos y la interrupción del ciclo estrogénico.

Trece ratones C57BL/6 hembra se inyectaron por vía intraperitoneal con 25 µg de anticuerpo anti-VEGF purificado cada 3 días durante 15 días. Los ciclos estrogénicos se controlaron diariamente tomando frotis vaginales y los ciclos estrogénicos de los ratones tratados se compararon con los de ratones de control inyectados con anticuerpos IgG no específicos. Conforme al efecto anti-angiogénico de los anticuerpos anti-VEGF educidos se observó una interrupción importante del ciclo estrogénico establecido, a partir del 3<sup>er</sup> día desde la inmunización (figura 2A). La duración media de los ciclos estrogénicos también disminuyó significativamente más del 66% (figura 2B). El crecimiento de los folículos primordiales se valoró a los días 3 y 7 de la inmunización recogiendo los ovarios de los ratones sacrificados. En los ratones tratados con anticuerpos anti-VEGF se comprobó una reducción importante y persistente del número de folículos primordiales ( $p < 0,05$  para ambas comparaciones), lo cual sugiere una potente eficacia anti-angiogénica de los anticuerpos de VEGF (figura 2C).

Estos datos demuestran en conjunto que los epítomos inmunogénicos de VEGF y EG-VEGF se pueden identificar y sintetizar, y que la inmunización induce la producción de anticuerpos anti-VEGF y anti-EG-VEGF. Estos anticuerpos son biológicamente activos y actúan como moléculas anti-angiogénicas.

#### *Determinación de la inmunogenicidad de los anticuerpos anti-VEGF y anti-EG-VEGF educidos de la inmunización activa con vacunas peptídicas*

Se comprobó mediante ELISA que los anticuerpos peptídicos anti-VEGF y anti-EG-VEGF reconocían la respectiva proteína humana recombinante VEGF (figura 3A) o EG-VEGF (figura 3B). En este experimento se usaron proteínas recombinantes para recubrir las placas de ELISA y se empleó el anticuerpo anti-péptido apropiado.

Además demostramos que los anticuerpos peptídicos anti-VEGF y anti-EG-VEGF reconocen el rhVEGF por Western blot, con las bandas resultantes en el sitio esperado (42 kD, dímero) para el VEGF analizado con un anticuerpo peptídico anti-VEGF (figura 4A) y un anticuerpo monoclonal de VEGF (NeoMarkers Ab-4, figura 4B). Asimismo, un Western blot con rhEGVEGF analizado con anticuerpos peptídicos anti-EG-VEGF (figura 4C) y una combinación de anticuerpos peptídicos anti-VEGF/anti-EG-VEGF (figura 4D) dio una banda en el sitio esperado (22 kD, dímero) para el rhEG-VEGF.

#### *Evaluación in vitro del efecto biológico de los anticuerpos peptídicos anti-VEGF y anti-EG-VEGF*

Después de demostrar las propiedades antigénicas e inmunogénicas de nuestros anticuerpos anti-péptido seguimos evaluando las propiedades funcionales de estas moléculas. Para determinar el efecto de nuestros anticuerpos peptídicos anti-VEGF en la interacción del VEGF con el receptor de VEGF utilizamos el ensayo de Fluorokine. En resumen, las células lavadas se incuban con la citocina biotinilada, que a su vez se une a las células por medio de receptores específicos de la superficie celular. Luego las células se incuban directamente con avidina-fluoresceína, la cual se fija a la citocina biotinilada unida al receptor. La citocina libre participa en una reacción de amplificación con la citocina fijada, que produce una señal intensificada sin comprometer la especificidad.

Las células que expresan los receptores específicos de citocina se tiñen de forma fluorescente con una intensidad de tinción proporcional a la densidad de los receptores. La densidad relativa de los receptores se determina luego por citometría de flujo mediante excitación con láser de 488 nm de longitud de onda. Mediante este experimento normalizamos inicialmente el componente de citometría de flujo del ensayo (A), en el cual se identificaron distintas poblaciones celulares empleando los controles positivos y negativos del kit suministrado. Tras la normalización utilizamos células HUVEC que proliferan bajo la influencia del VEGF, a fin de determinar la eficacia de fijación de nuestros anticuerpos anti-péptido al VEGF, produciendo la interrupción de la interacción normal VEGF-receptor de VEGF. Como puede verse en la figura 5B, se observa un desplazamiento de la población hacia una menor densidad de receptor cuando se usan anticuerpos peptídicos anti-VEGF, lo cual sugiere una interrupción de la interacción normal VEGF-receptor de VEGF.

#### *Evaluación in vivo del efecto biológico anti-angiogénico de las vacunas peptídicas anti-VEGF*

Aunque ya hemos demostrado la interacción entre el VEGF y nuestros anticuerpos anti-péptido de VEGF, aún es importante determinar si el efecto de esta interacción produce una modificación de las propiedades angiogénicas del VEGF. Para determinar las propiedades anti-angiogénicas de nuestros anticuerpos inyectamos matrigel (membrana basal generada a partir de sarcoma EHS) por vía subcutánea a ratones C57/BL6 inmunocompetentes, con o sin rhVEGF. A los 7 días se retiró la matrigel y las secciones criostatizadas se cortaron y tiñeron con un conjugado de CD31 (que se une a células endoteliales) y ficoeritrina. La angiogénesis se determinó cualitativa y cuantitativamente por microscopia confocal de fluorescencia. La adición de rhVEGF a la matrigel produjo un aumento significativo de la angiogénesis respecto al control.

Esta descripción se entiende más a fondo atendiendo a las instrucciones de las referencias citadas en ella.

En esta descripción las formas de ejecución ilustran las materializaciones de la presente invención y no se deben interpretar como límite de su alcance. El especialista reconoce que la invención reivindicada puede incluir muchas otras formas de ejecución y que la descripción y los ejemplos solo se contemplan como un modelo, estando el verdadero alcance y espíritu de la presente invención indicado por las reivindicaciones adjuntas.

Esta solicitud de patente es divisional de la solicitud de patente europea nº 05722777.9 (la "solicitud original de patente"), también publicada con el nº EP 1730182. El contenido de las reivindicaciones iniciales de la solicitud original de patente se repite a continuación en esta descripción y forma parte de su contenido, tal como sigue:

1. Un polipéptido aislado o purificado que comprende un epítipo de VEGF, de unos 10 hasta 50 aminoácidos, y todo un polipéptido o una porción contigua del mismo seleccionada entre a) KCECRPKKDRARQENPCG, b) CTPLGREGEECHPGSHKV, c) los aminoácidos 4 hasta 21 del VEGF humano, d) los aminoácidos 24 hasta 38 del VEGF humano, e) los aminoácidos 127 hasta 144 del VEGF humano, f) los aminoácidos 102 hasta 122 del VEGF humano, g) los aminoácidos 162 hasta 175 del VEGF humano, h) los aminoácidos 76 hasta 96 del VEGF humano, i) los aminoácidos 5 hasta 15 de la EG-VEGF humana, j) los aminoácidos 24 hasta 34 de la EG-VEGF humana, k) los aminoácidos 50 hasta 75 de la EG-VEGF humana y los aminoácidos 86 hasta 105 de la EG-VEGF humana.
2. Un péptido quimérico de VEGF, de unos 35 hasta 150 aminoácidos, que comprende a) al menos un epítipo de VEGF o un equivalente antigénico o funcional del mismo, b) un epítipo de células T colaboradoras y c) un péptido de unos 2 hasta 10 aminoácidos que une los elementos a) y b).
3. El péptido quimérico de VEGF según el punto 2, que tiene aproximadamente 35 hasta 70 aminoácidos.
4. El péptido quimérico de VEGF según el punto 2, en el cual el epítipo de células T colaboradoras es un epítipo promiscuo de células Th.
5. El péptido quimérico de VEGF según el punto 2, en el cual el epítipo de células T colaboradoras comprende aproximadamente 14 hasta 22 aminoácidos.
6. El péptido quimérico de VEGF según el punto 2, en el cual el epítipo de células T colaboradoras comprende una secuencia escogida entre TT, TT1, P2, P30, MVF, HBV y CSP.
7. El péptido quimérico de VEGF según el punto 2, en el cual el péptido que une los elementos a) y b) contiene la secuencia Gly-Pro-Ser-Leu.
8. Un péptido multivalente de VEGF que comprende a) varios epítipos de VEGF según el punto 1 o equivalentes funcionales del mismo y b) al menos un epítipo de células Th, estando a) y b) conectados por una estructura central de láminas  $\beta$ .
9. El péptido multivalente de VEGF según el punto 8, en el cual la estructura central de láminas  $\beta$  comprende dos cadenas alternantes de restos de leucina y lisina.

10. Una composición inmunogénica que comprende al menos un inmunógeno escogido entre el polipéptido aislado o purificado según la reivindicación 1 y el péptido quimérico de VEGF según el punto 2, y al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

5 11. Una composición inmunogénica que comprende el péptido multivalente de VEGF según el punto 8 y al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

12. Un método para tratar una malignidad supuestamente relacionada con el VEGF, que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto seleccionado entre el polipéptido aislado o purificado según la reivindicación 1 y el péptido quimérico de VEGF según el punto 2.

10 13. Un método para tratar una malignidad supuestamente relacionada con el VEGF, que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido multivalente de VEGF según el punto 8.

14. Un polinucleótido que codifica el polipéptido aislado o purificado según la reivindicación 1 o el péptido quimérico de VEGF según el punto 2.

15. Un polinucleótido que codifica el péptido multivalente de VEGF según el punto 8.

15 LISTA DE SECUENCIAS

<110> KAUMAYA, PRAVIN COHN, DAVID

<120> PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DE VEGF

20 <130> 22727-04210

<140> 11/052,721

<141> 2005-02-07

<150> 60/542,041

<151> 2004-02-05

<160> 10

25 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 190

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 1

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
  1                               5                               10                               15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
                               20                               25                               30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
                               35                               40                               45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Asp Ile Phe Gln Glu Tyr
  50                               55                               60

Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
  65                               70                               75                               80

Arg Cys Gly Gly Cys Ser Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr
                               85                               90                               95

Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln
  100                               105

Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu
  115                               120                               125

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro
  130                               135                               140

Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
  145                               150                               155                               160

Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr His Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu
  165                               170                               175

Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
  180                               185                               190
    
```

ES 2 617 062 T3

5 <210> 2  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val  
 1 5 10 15

Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys  
 20 25 30

Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg  
 35 40 45

Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser  
 50 55 60

His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys  
 65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys  
 85 90 95

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe  
 100 105

10 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium tetani  
 <400> 3

15 Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Ile Tyr Ser Tyr Phe  
 1 5 10 15

Pro Ser Val

20 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium tetani  
 <400> 4

Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Gln Ser Ser  
 1 5 10 15

Glu

25 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium tetani  
 <400> 5

30 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

35 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium tetani  
 <400> 6

40

ES 2 617 062 T3

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Ser His Leu Glu  
 20  
 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Virus del sarampión  
 <400> 7  
 Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val  
 1 5 10 15  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la hepatitis B  
 <400> 8  
 Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Plasmodium vivax  
 <400> 9  
 Thr Cys Gly Val Gly Val Arg Val Arg Ser Arg Val Asn Ala Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Pro Glu  
 20  
 <210> 10  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: conector peptídico sintético  
 <400> 10  
 Gly Pro Ser Leu  
 1

## REIVINDICACIONES

1. Péptido quimérico que comprende:  
 (a) al menos un epítipo de VEGF humano constituido por KCECRPKKDRARQENPCG;  
 (b) un epítipo de células T colaboradoras seleccionado del grupo constituido por NSVDDALINSTIYSYFPSV (TT), PGINGKAIHLVNNQSSE (TT1), QYIKANSKFIGITEL (P2), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (P30), LSEIKGVIVHRLEGV (MVF), FLLTRILTIPQSLN (HBV) y TCGVGVRVRSRVNAANKKPE (CSP); y  
 (c) un conector de 2 a 15 aminoácidos de longitud que une al menos un epítipo de VEGF al epítipo de células T colaboradoras,  
 en el cual el conector está unido operativamente al C terminal de al menos un epítipo de VEGF y al N terminal del epítipo de células T colaboradoras.
2. El péptido quimérico según la reivindicación 1, en el cual el epítipo de células T colaboradoras es LSEIKGVIVHRLEGV (MVF).
3. El péptido quimérico según la reivindicación 1, en el cual el conector es Gly-Pro-Ser-Leu.
4. Un péptido que comprende:  
 (a) un primer epítipo de VEGF constituido por KCECRPKKDRARQENPCG, unido operativamente a por lo menos un segundo epítipo de VEGF seleccionado del grupo formado por  
 los aminoácidos 4 hasta 21 de la SEQ ID n°: 1,  
 los aminoácidos 24 hasta 38 de la SEQ ID n°: 1,  
 los aminoácidos 76 hasta 96 de la SEQ ID n°: 1,  
 los aminoácidos 102 hasta 122 de la SEQ ID n°: 1,  
 los aminoácidos 126 hasta 143 de la SEQ ID n°: 1,  
 los aminoácidos 162 hasta 175 de la SEQ ID n°: 1,  
 los aminoácidos 5 hasta 15 de la SEQ ID n°: 2,  
 los aminoácidos 24 hasta 34 de la SEQ ID n°: 2,  
 los aminoácidos 50 hasta 67 de la SEQ ID n°: 2,  
 los aminoácidos 50 hasta 75 de la SEQ ID n°: 2, y  
 los aminoácidos 86 hasta 102 de la SEQ ID n°: 2;  
 (b) al menos un epítipo de células T colaboradoras; y  
 (c) un primer conector que une operativamente el primer y segundo epítipos de VEGF con al menos un epítipo de células T colaboradoras,  
 en el cual el primer conector consta de dos cadenas de restos alternantes de leucina y lisina que están unidas por un segundo conector, y  
 en el cual el primer conector está unido operativamente al C terminal del primer y segundo epítipos de VEGF unidos operativamente y también unido operativamente al N terminal de al menos un epítipo de células T colaboradoras.
5. El péptido según la reivindicación 4, en el cual el epítipo de células T colaboradoras se selecciona del grupo constituido por NSVDDALINSTIYSYFPSV (TT), PGINGKAIHLVNNQSSE (TT1), QYIKANSKFIGITEL (P2), FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (P30), LSEIKGVIVHRLEGV (MVF), FLLTRILTIPQSLN (HBV) y TCGVGVRVRSRVNAANKKPE (CSP).
6. El péptido según la reivindicación 5, en el cual el epítipo de células T colaboradoras es LSEIKGVIVHRLEGV (MVF).
7. El péptido según la reivindicación 4, en el cual el primer conector es Gly-Pro-Ser-Leu.
8. El péptido según la reivindicación 4, en el cual el segundo conector es un péptido de 2 a 15 aminoácidos.
9. El péptido según la reivindicación 8, en el cual el segundo conector es Gly-Pro-Ser-Leu.
10. Una composición inmunogénica que comprende el péptido según la reivindicación 1 y al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.
11. Una composición inmunogénica que comprende el péptido según la reivindicación 4 y al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.
12. Un polinucleótido que codifica el péptido según la reivindicación 1.
13. Un polinucleótido que codifica el péptido según la reivindicación 4.

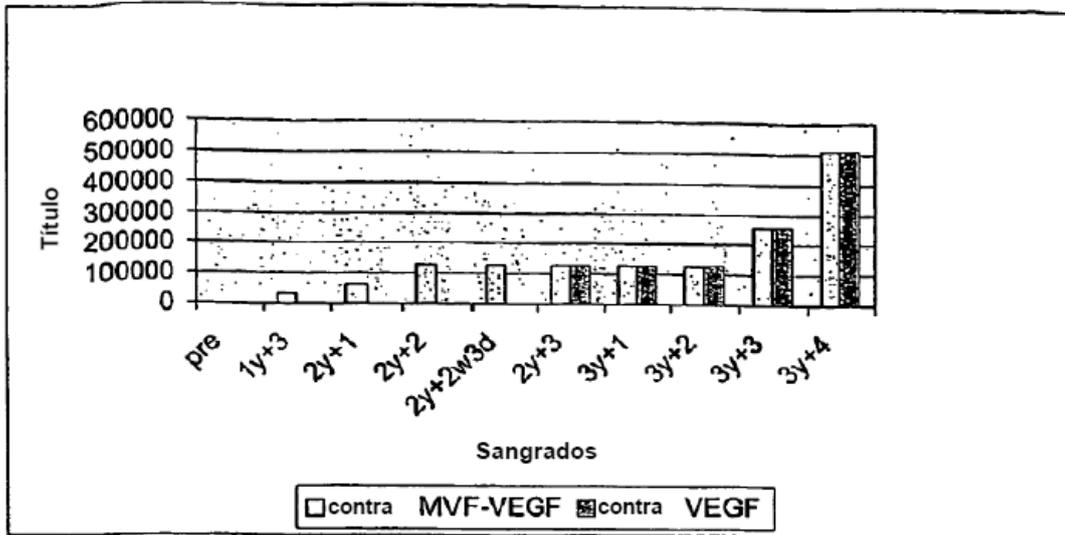


FIGURA 1

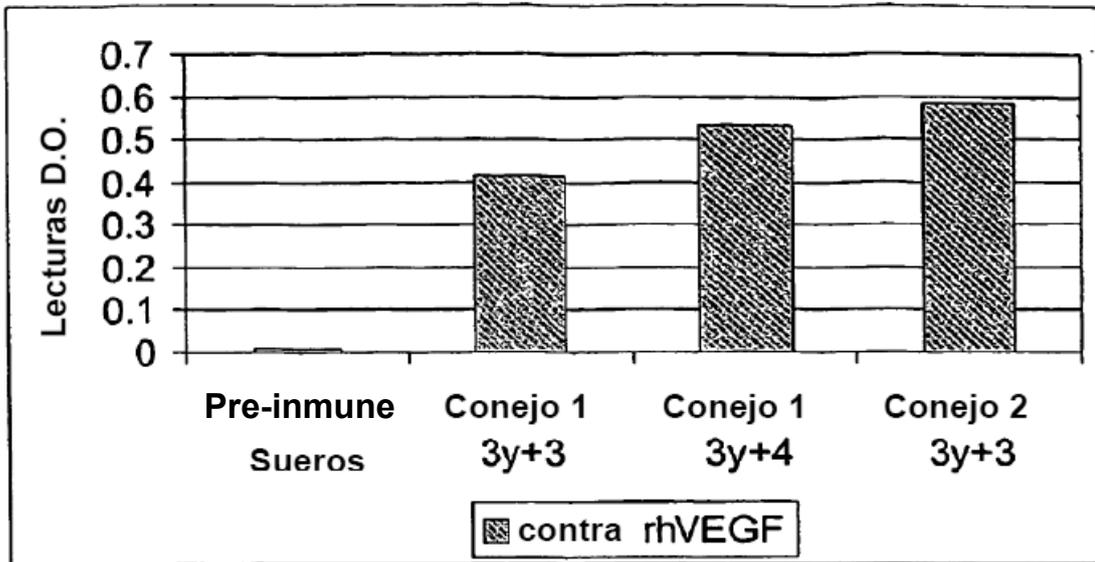
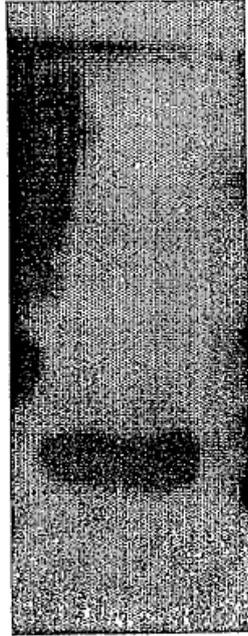


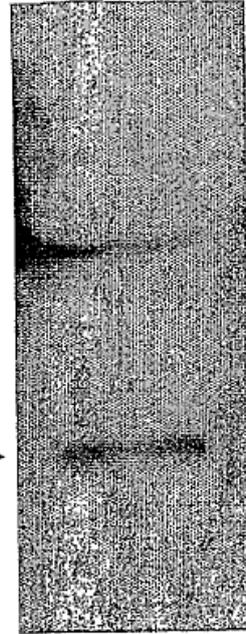
FIGURA 2

A.



Anticuerpo del péptido VEGF

B.

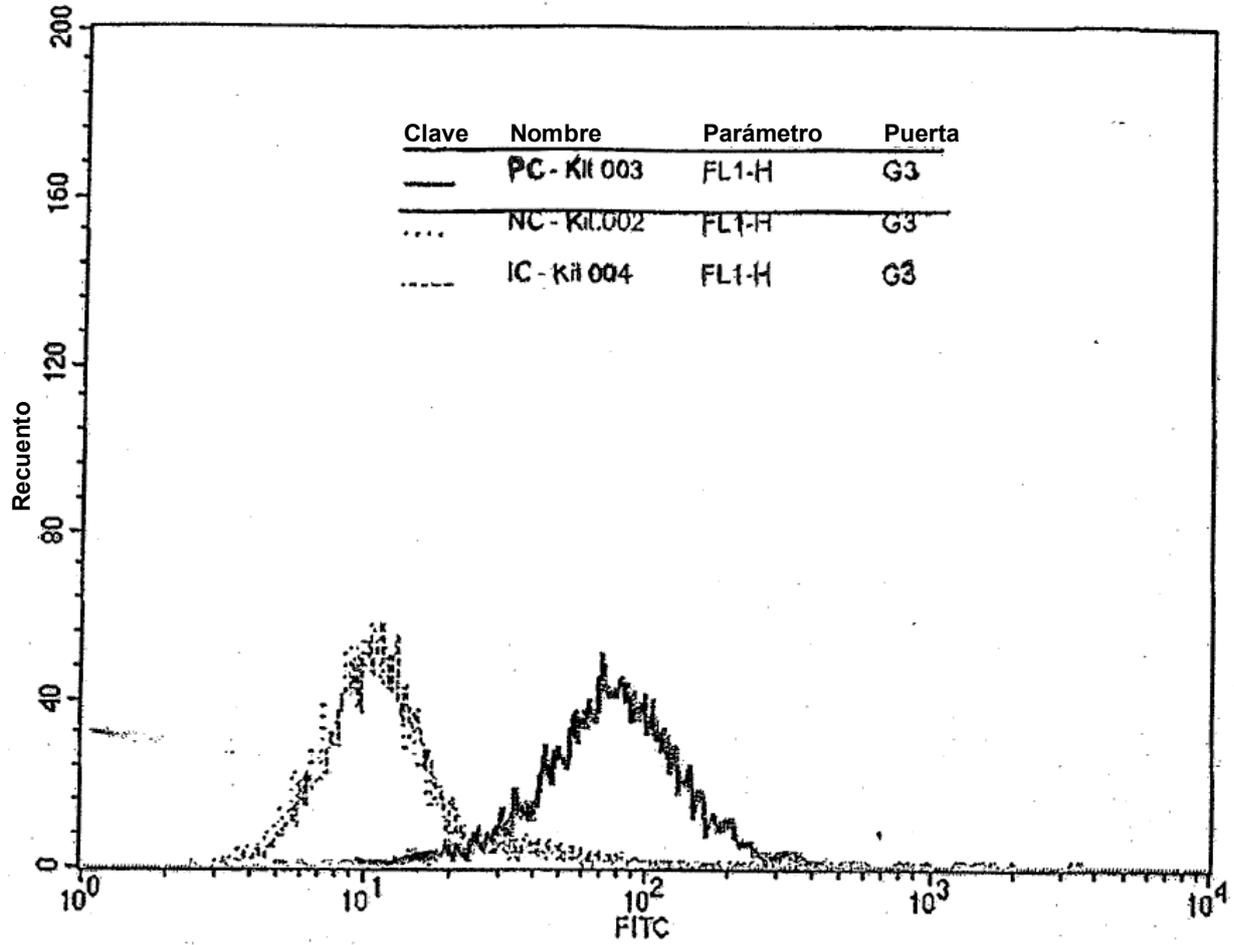


Ab-4 (Ab monoclonal del VEGF)

← 42 kDa →

**FIGURA 3**

A.

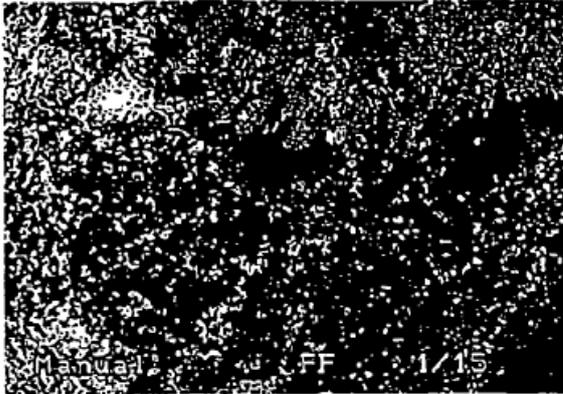


Optimización de PC/NC

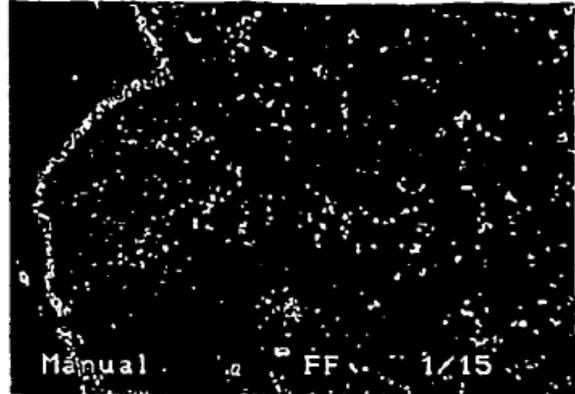
FIGURA 4

A.

B.



Matrigel® y rhVEGF



Matrigel®, anticuerpos de péptidos de rhVEGF y VEGF

FIGURA 5

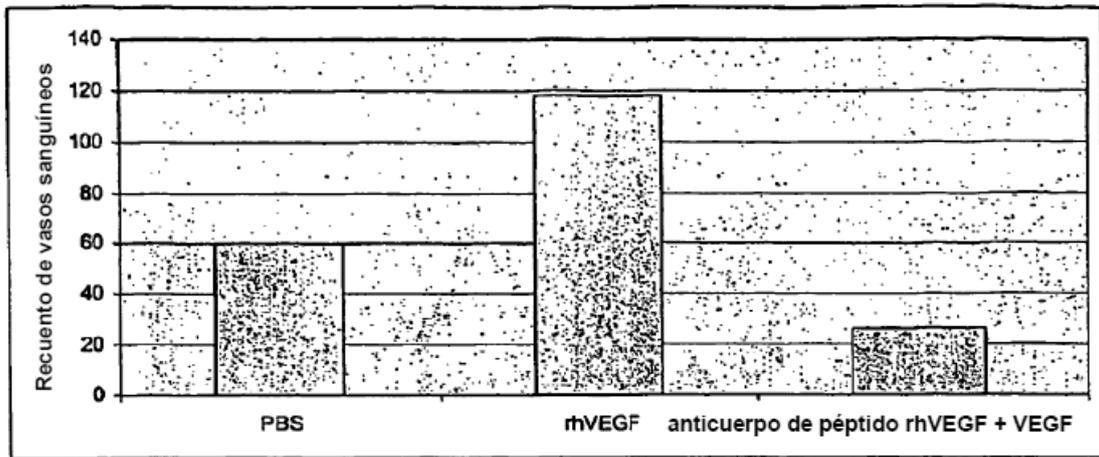
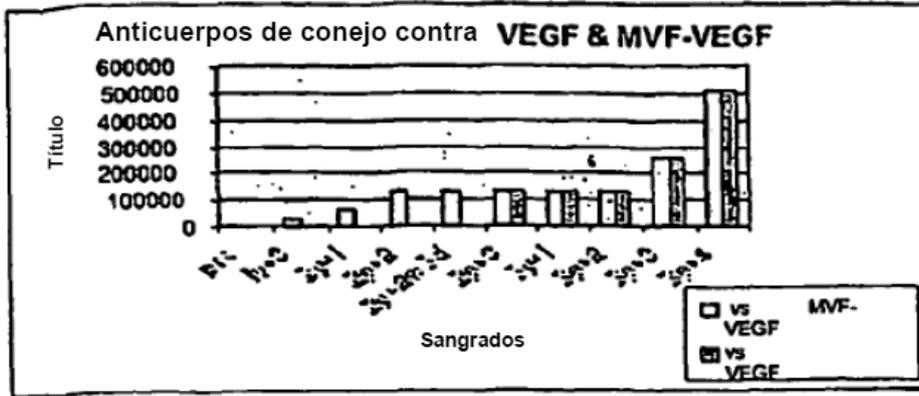


FIGURA 6

A.



B.

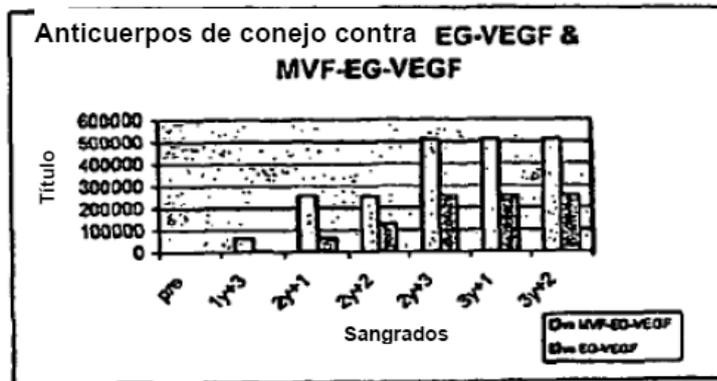
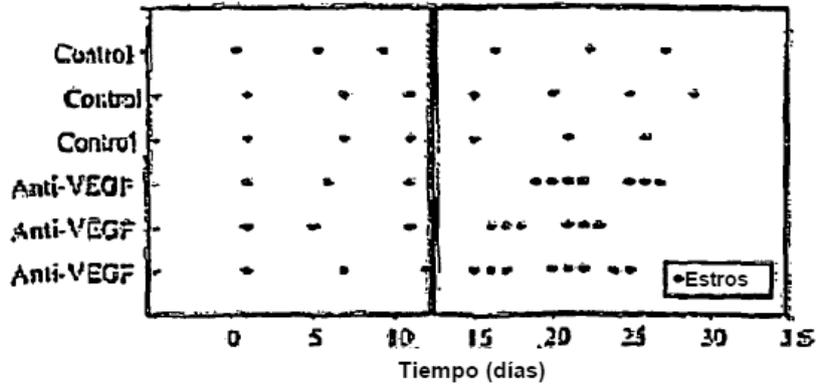


FIGURA 7

A.



B.

Ciclo estrogénico		
	Pretratamiento	Postratamiento
Control	5.15±0.27	4.57±0.32
anti-VEGF	5.9±0.22	1.71±0.21

C.

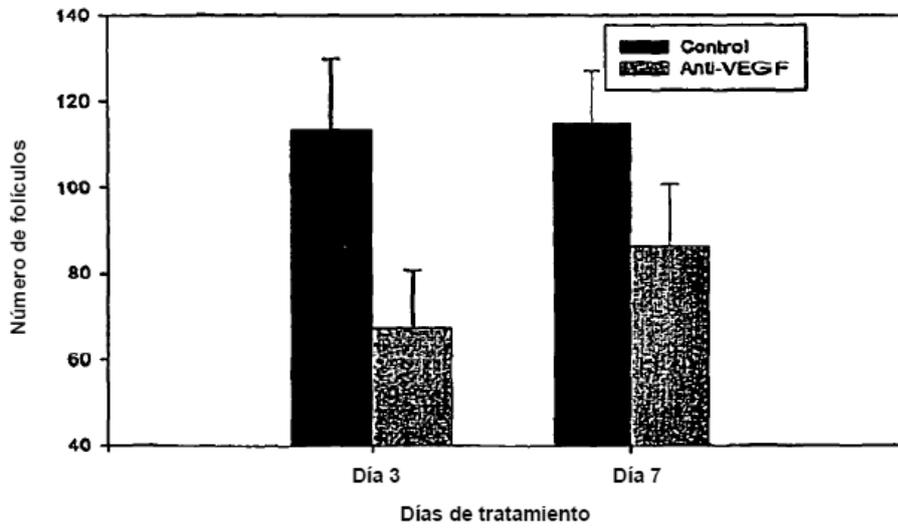


FIGURA 8

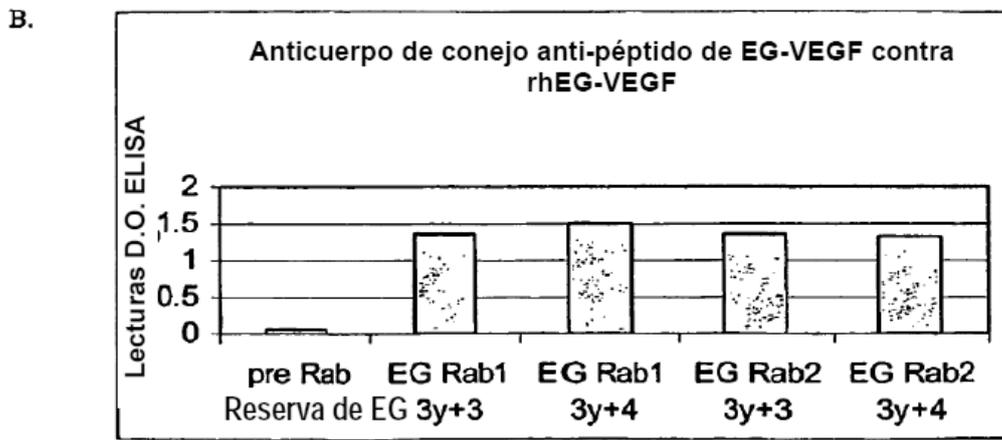
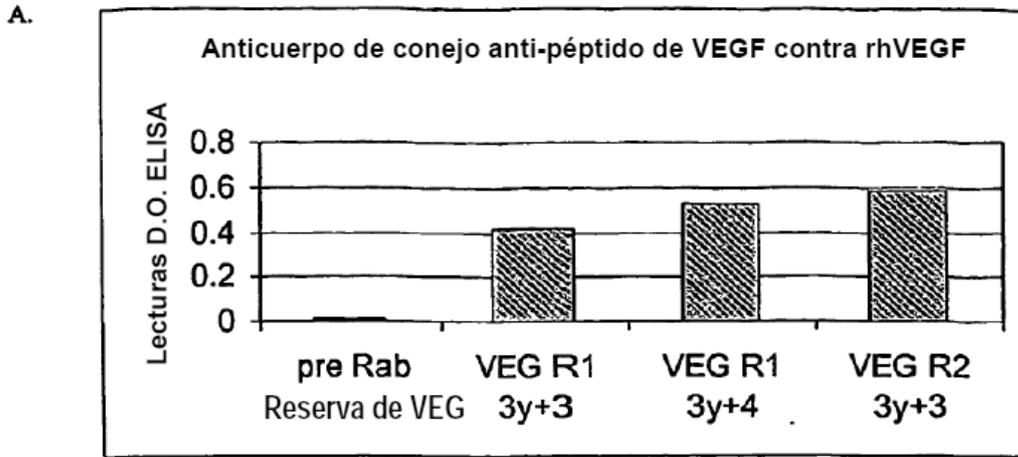


FIGURA 9

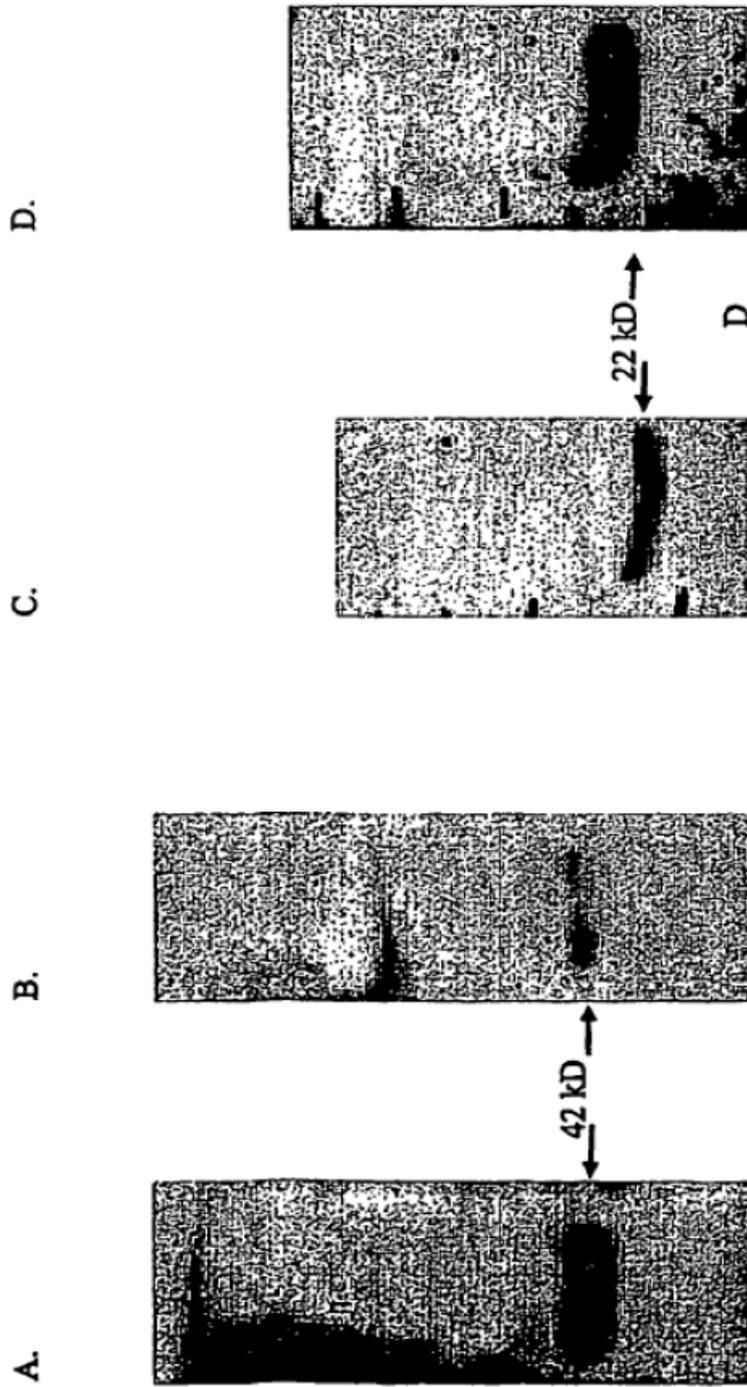
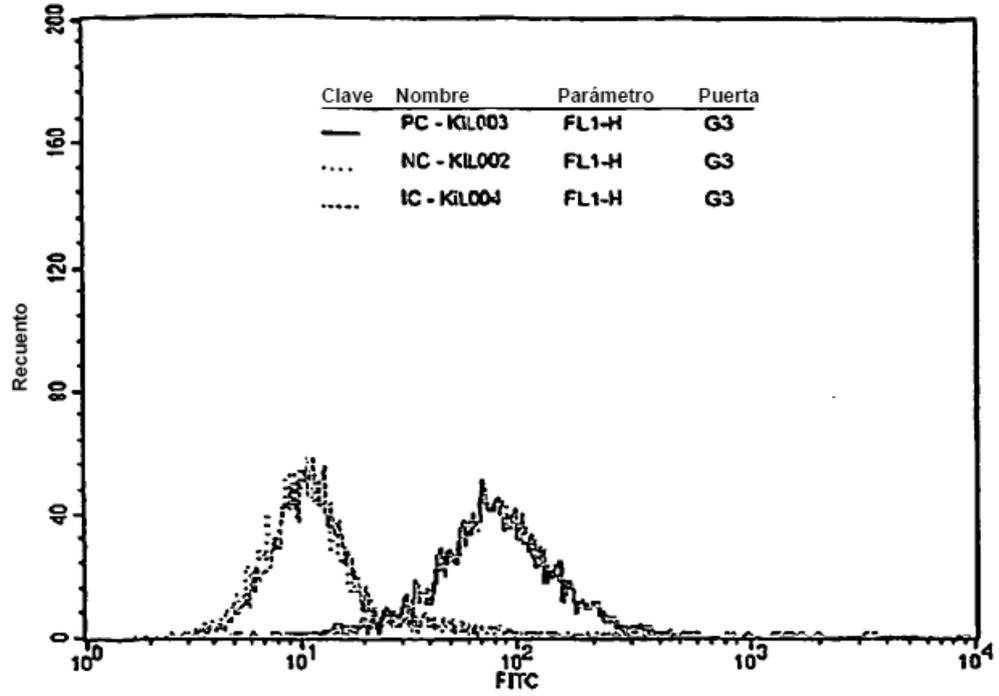


Figura 10

A.



B.

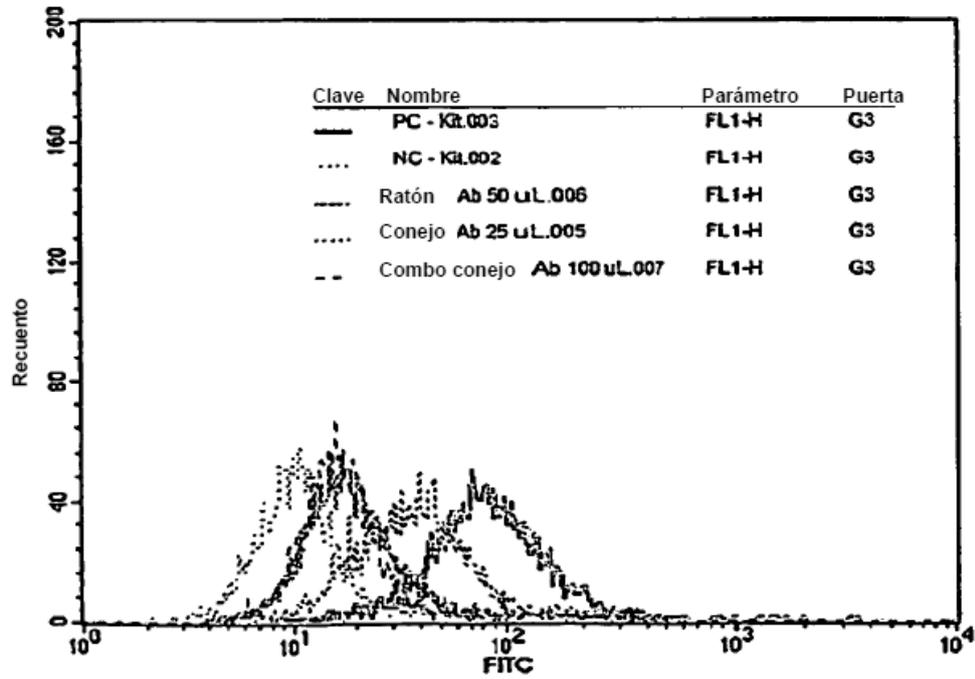


FIGURA 11

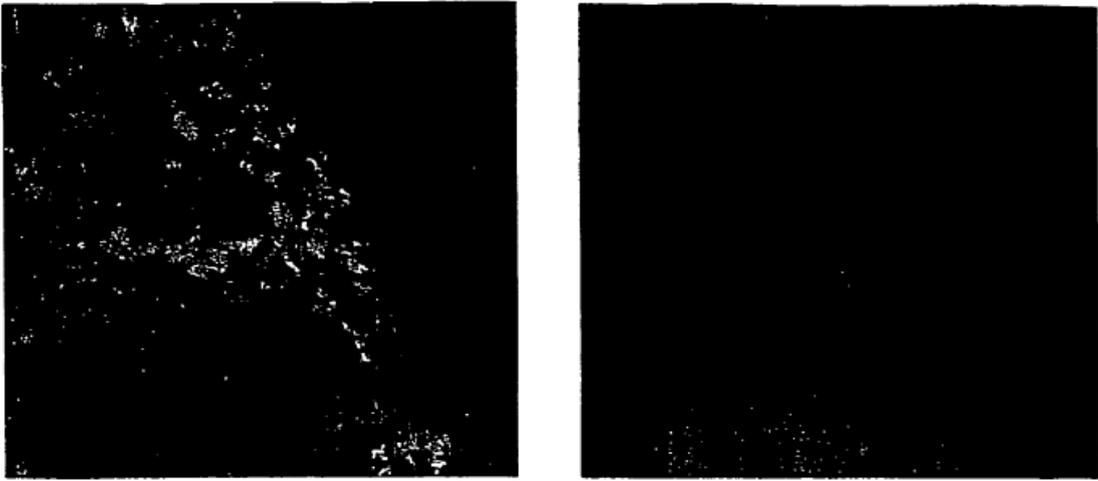


FIGURA 12