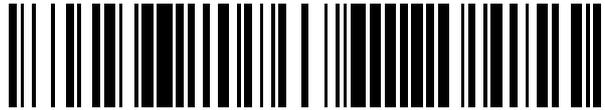


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 757**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2011 E 11181090 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2570135**

54 Título: **Vacuna de PCSK9**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.04.2016**

73 Titular/es:  
**AFFIRIS AG (100.0%)**  
**Karl-Farkas-Gasse 22**  
**1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:  
**BRUNNER, SYLVIA;**  
**GALABOVA, GERGAN;**  
**WANKO, BETTINA;**  
**WINDWARDER, MARKUS;**  
**WINSAUER, GABRIELE;**  
**STAFFLER, GÜNTHER y**  
**JUNO, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:  
**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 565 757 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

Vacuna de PCSK9.

5 La presente invención se refiere al desarrollo de una nueva vacuna combinada de péptidos inmunógenos contra PCSK9 derivada de una combinación de dos epítomos PCSK9 diferentes unidos a un portador inmunógeno. La vacuna se genera para la prevención y/o el tratamiento de trastornos de salud causados por hiperlipemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis.

10 La hiperlipemia, la hipercolesterolemia, la hipertensión y la aterosclerosis son trastornos cardiovasculares considerados factores principales en la letalidad mundial. Conjuntamente con factores tales como la obesidad, la diabetes, el tabaquismo y la falta de actividad física, factores principales en el desarrollo de las alteraciones cardiovasculares, se encuentran trastornos genéticos tales como la hipercolesterolemia dominante autosómica (HDA). La HDA se considera un factor importante en el desarrollo de algunos trastornos cardiovasculares y se  
15 manifiesta por un metabolismo del colesterol alterado y niveles incrementados de lipoproteína de baja densidad-colesterol, que posteriormente conduce a la formación de enfermedad arterial coronaria (EAC) prematura.

Es conocido que tres alteraciones genéticas principales podrían causar el desarrollo de HDA. La forma clásica de la HDA está causada por mutaciones en el receptor de la lipoproteína de baja densidad (en adelante denominada RLBD). Además, las mutaciones en la apolipoproteína B-100 (apoB-100) y más concretamente en su dominio de unión a ligandos alteran la unión de ApoB-100 a RLBD, que a continuación conduce a un metabolismo del colesterol alterado. Finalmente, el tercer y más recientemente descubierto elemento que, por alteraciones genéticas, podría estar implicado en el desarrollo de la HDA es la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (en adelante denominada PCSK9).

25 La PCSK9, también conocida como convertasa 1 neural regulada por la apoptosis (NARC-1), es una subtilasa similar a la proteinasa K identificada como el noveno elemento de la familia de la subtilasa secretoria. La proteína PCSK9 es sintetizada en forma de un proproteína de ~72 kDa, que experimenta corte autocatalítico entre el prodominio y el dominio catalítico, conduciendo en consecuencia a la generación de la forma proteica madura. El prodominio (~14 kDa) permanece unido a la proteína madura de 63 kDa y en esta forma la proteína madura sigue hacia la ruta secretoria.

30 La función de PCSK9 en la homeostasis de los lípidos ya es bien conocida. No sólo eso, la expresión de PCSK9 está regulada por la proteína de unión al elemento regulador del esteroles (en adelante denominado PUERE) de una manera similar a otros genes sensibles a PUERE que participan en la homeostasis de los lípidos. Sin embargo, PCSK9 también participa en la eliminación de la lipoproteína de baja densidad-colesterol (en adelante denominada LDLc) al fomentar la internalización y degradación del RLDL.

40 Los estudios *in vitro* e *in vivo* subrayan el papel esencial de PCSK9 en la incorporación de la lipoproteína de baja densidad-colesterol a partir de la sangre. Por un lado la sobreexpresión adenovírica de PCSK9 incrementa significativamente los niveles de LDLc circulante y, por otro lado, los ratones PCSK9<sup>-/-</sup> muestran un incremento de 2,8 veces de los niveles de RLDL y la reducción de los niveles de LDLc en comparación con los animales de tipo salvaje.

45 El gen se localiza en el cromosoma humano 1p33-p34.3 y se expresa en tejidos tales como el hígado, el riñón, el cerebelo y el intestino delgado. Muchos estudios confirman que las "mutaciones de ganancia de función" provocan una reducción del nivel de RLDL y la consecuente hipercolesterolemia y predisposición a la aterosclerosis. Las "mutaciones de pérdida de función" incrementan los niveles de RLDL, con la consecuente reducción del nivel de lipoproteína de baja densidad-colesterol (LDLc).

50 Conjuntamente, PCSK9 regula los niveles de RLDL postranscripcionalmente y, por lo tanto, es una diana atractiva para el tratamiento de la aterosclerosis.

55 Simultáneamente se han consolidado numerosas estrategias y enfoques diferentes para inhibir la función de PCSK9.

La aplicación de ARNip contra PCSK9 en monos (*Macaca fascicularis*) ha conducido a una reducción significativa del colesterol total. Otras investigaciones con anticuerpos monoclonales y policlonales contra PCSK9 en ratones y primates no humanos han conseguido regular positivamente el RLDL con una reducción concomitante de los niveles de colesterol total y de LDLc.

60 La reducción de los niveles de PCSK9 por la terapia de anticuerpos monoclonales o policlonales o la inactivación de PCSK9 con inhibidores de molécula pequeña y tecnología de inactivación génica ("knock out") no ha demostrado presentar ningún efecto secundario en diferentes modelos animales. Por lo tanto, globalmente PCSK9 es una diana muy atractiva para el tratamiento de la aterosclerosis.

65 El documento nº WO 2011/027257 A2 da a conocer péptidos PCSK9 antigénicos unidos a un portador inmunogénico

como vacuna. El documento nº WO 2009/100297 A1 da a conocer antagonistas de PCSK9 que inhiben la función de PCSK9. El documento nº WO 2010/057242 A2 se refiere a vacunas con fragmentos de PCSK9 específicos.

5 Un objetivo de la presente invención es proporcionar una vacuna basada en péptidos contra PCSK9 que es capaz de inhibir PCSK9 y anular/reducir la interacción entre PCSK9 y RLDL. Esto conduce a niveles incrementados de RLDL en los hepatocitos del hígado y la posterior reducción de los niveles de colesterol total y LDLc.

10 Dicho objetivo se consigue con una vacuna que comprende una multiplicidad (más de uno, por lo menos dos) fragmentos de pro-proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9), en la que por lo menos un fragmento de dicha multiplicidad comprende por lo menos 8 residuos aminoácidos consecutivos de entre los residuos aminoácidos 150 a 170 de PCSK9 (SEC ID nº 9) y por lo menos un fragmento comprende por lo menos 8 residuos aminoácidos consecutivos de entre los residuos aminoácidos 205 y 225 de PCSK9 (SEC ID nº 9).

15 Inesperadamente ha resultado que una vacuna que comprende por lo menos dos fragmentos peptídicos diferentes de PCSK9 tal como se ha definido anteriormente puede incrementar la cantidad de receptores de LDL de manera mucho más eficaz que una vacuna que comprende únicamente un fragmento de PCSK9. La administración de la vacuna de la presente invención conduce, por ejemplo, a un incremento de los niveles de receptor de lipoproteína de baja densidad en los hepatocitos del hígado *in vivo*. Como consecuencia de lo anterior, los valores medios de LDLc y colesterol total en el plasma sanguíneo con la administración de la vacuna se reducen significativamente. Por lo tanto, la administración de una vacuna según la presente invención permite tratar o prevenir enfermedades causadas por hiperlipemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis con una eficiencia y exactitud mucho más altas que con la administración de péptidos individuales. En una forma de realización preferida de la presente invención, todos los fragmentos de PCSK9 de la vacuna de la presente invención proceden de los fragmentos de PCSK9 que consisten en los residuos aminoácidos 150 a 170 y 205 a 225 del SEC ID nº 9.

20 Los fragmentos peptídicos utilizados en la vacuna de la presente invención comprenden por lo menos 8, preferentemente por lo menos 9, más preferentemente por lo menos 10, residuos aminoácidos consecutivos de entre los residuos aminoácidos 150 y 170, preferentemente de entre los residuos aminoácidos 153 y 165, y de entre 205 y 225, preferentemente de entre los residuos aminoácidos 209 y 222, de PCSK9 (SEC ID nº 9).

30 SEC ID nº 9 (secuencia de aminoácidos de PCSK9):

```
MGTVSSRRSW WPLPLLLLLL LLLGPAGARA QEDEDGDYEE LVLALRSEED GLAEAPEHGT TATFHCAKD
PWRLPGTYVV VLKEETHLSQ SERTARRLQA QAARRGYLTK ILHVFHGLLP GFLVKMSGDL LELALKLPHV
DYIEEDSSVF AQSIPWNLER ITPPRYRADE YQPPDGGSLV EVYLLDTSIQ SDHREIEGRV MVTDFENVPE
EDGTRFHRQA SKCDSHGTHL AGVVSGRDAG VAKGASMRSL RVLNCQGKGT VSGTLIGLEF IRKSQLVQPV
GPLVLLPLA GGYSRVLNAA CQLARAGVV LVTAAGNFRD DACLYSPASA PEVITVGATN AQDQPVTLGT
LGTNFGRCVD LFAPGEDIIG ASSDCSTCFV SQSGTSQAAA HVAGIAAMML SAEPELTAE LRQLIHFSFA
KDVINEAWFP EDQRVLTPNL VAALPPSTHG AGWQLFCRTV WSAHSGPTRM ATAVARCAPD EELLSCSSFS
RSGKRRGERM EAQGGKLVCR AHNAFGGEGV YAIARCCLLP QANCSVHTAP PAEASMGTRV HCHQQGHVLT
GCSSHWEVED LGTHKPPVLR PRGQPNQCVG HREASIHASC CHAPGLECKV KEHGIPAPQE QVTVACEEGV
TLTGCSALPG TSHVLGAYAV DNTCVVRSRD VSTTGSTSEG AVTAVAICCR SRHLAQASQE LQ
```

35 Los fragmentos derivados de PCSK9 comprenden o consisten de entre preferentemente 8 y 20, más preferentemente de entre 10 y 15, residuos aminoácidos. Según una forma de realización particularmente preferente de la presente invención, los péptidos derivados de los residuos aminoácido 150 a 170 de PCSK9 comprenden entre 8 y 15, preferentemente entre 10 y 13, residuos aminoácidos. Los péptidos derivados de los residuos aminoácidos 205 a 225 de PCSK9 comprenden entre 8 y 16, preferentemente entre 10 y 14, residuos aminoácidos.

40 La vacuna de la presente invención es una combinación de por lo menos 2, preferentemente de por lo menos 3, más preferentemente de por lo menos 4, todavía más preferentemente de por lo menos 5, péptidos derivados de los residuos aminoácidos 150 a 170 y/o 205 a 225 de PCSK9 (SEC ID nº 9). Dicha combinación comprende por lo menos dos secuencias con diferente origen epitópico.

45 Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse químicamente mediante métodos bien conocidos en la técnica. Evidentemente también resulta posible producir los péptidos de la presente invención utilizando métodos recombinantes. Los péptidos pueden producirse en microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos, en células eucarióticas tales como células de mamífero o de insecto, o en un vector vírico recombinante, tal como

adenovirus, poxvirus, virus herpes, virus del bosque de Simliki, baculovirus, bacteriófagos, virus Sindbis o virus Sendai. Entre las bacterias adecuadas para producir los péptidos se incluyen *E. coli*, *B. subtilis* o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar dichos péptidos. Entre las células de levadura adecuadas para expresar los péptidos de la presente invención se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastoris* o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los métodos y métodos correspondientes son bien conocidos en la técnica. También son conocidos en la técnica métodos para aislar y purificar péptidos producidos recombinantemente y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la filtración en gel, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico, etc.

Con el fin de facilitar el aislamiento de los péptidos de la presente invención, pueden generarse polipéptidos de fusión en los que los péptidos se encuentran traduccionalmente fusionados (unidos covalentemente) con un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Los polipéptidos heterólogos típicos son las etiquetas de His (por ejemplo His6, 6 residuos de histidina), la etiqueta de GST (glutación-S-transferasa), etc. El polipéptido de fusión facilita no sólo la purificación de los péptidos sino que también evita la degradación de los péptidos durante las etapas de purificación. Si se desea eliminar el polipéptido heterólogo después de la purificación, el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de corte en la unión entre el péptido y el polipéptido heterólogo. El sitio de corte puede consistir de una secuencia de aminoácidos que se corta con un enzima específico para la secuencia de aminoácidos en el sitio (por ejemplo proteasas).

Según la presente invención, se obtiene por lo menos un fragmento a partir de los residuos aminoácidos 150 a 170 y se obtiene por lo menos un fragmento a partir de los residuos aminoácidos 205 a 225 de PCSK9 (SEC ID nº 9).

La vacuna de la presente invención comprende fragmentos de PCSK9 de diferentes partes de la proteína PCSK9. Por lo tanto, resulta particularmente preferido que por lo menos un fragmento se derive de un fragmento de PCSK9 específico, mientras que se obtiene por lo menos un fragmento de otro fragmento de PCSK9 específico.

Según otra forma de realización preferida de la presente invención dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 se seleccionan de entre el grupo que consiste en péptidos que presentan la secuencia de aminoácidos SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2), PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5), EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6), SIPWNLERITP (SEC ID nº 7) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8).

Dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 además pueden consistir o comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de:

FAQSIPWNLERITPPRYRAD (SEC ID nº 10), FAQSIPWNLERITPPRYRA (SEC ID nº 11), FAWSIPWNLERITPPRYR (SEC ID nº 12), FAQSIPWNLERITPPRY (SEC ID nº 13), FAQSIPWNLERITPPR (SEC ID nº 14), FAQSIPWNLERITPP (SEC ID nº 15), AQSIPWNLERITPPRYRAD (SEC ID nº 16), QSIPWNLERITPPRYRAD (SEC ID nº 17), SIPWNLERITPPRYRAD (SEC ID nº 18), AQSIPWNLERITPPRYRA (SEC ID nº 19), QSIPWNLERITPPRYRA (SEC ID nº 20), SIPWNLERITPPRYRA (SEC ID nº 21), AQSIPWNLERITPPRYR (SEC ID nº 22), QSIPWNLERITPPRYR (SEC ID nº 23), SIPWNLERITPPRYR (SEC ID nº 24), QSIPWNLERITPPRY (SEC ID nº 25), SIPWNLERITPPRY (SEC ID nº 26), AQSIPWNLERITPPR (SEC ID nº 27), QSIPWNLERITPPR (SEC ID nº 28), SIPWNLERITPP (SEC ID nº 29), ENVPEEDGTRFHRQASKCDS (SEC ID nº 30), ENVPEEDGTRFHRQASKC (SEC ID nº 32), ENVPEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 33), NVPEEDGTRFHRQASKCDS (SEC ID nº 34), VPEEDGTRFHRQASKCDS (SEC ID nº 35), PEEDGTRFHRQASKCDS (SEC ID nº 36), NVPEEDGTRFHRQASKCD (SEC ID nº 37), VPEEDGTRFHRQASKCD (SEC ID nº 38), PEEDGTRFHRQASKCD (SEC ID nº 39), NVPEEDGTRFHRQASKC (SEC ID nº 40), VPEEDGTRFHRQASKC (SEC ID nº 41), PEEDGTRFHRQASKC (SEC ID nº 42), NVPEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 43), VPEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 44), PEEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 45).

Dicho por lo menos un fragmento de PCSK9 preferentemente presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2), SIPWNLERITP (SEC ID nº 7) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8) y por lo menos un fragmento de PCSK9 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la vacuna de la presente invención comprende: SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3), SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4), SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5), SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6), PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8), EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7) o EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8), en el que una vacuna que comprende PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y

SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8) o EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8) resulta particularmente preferente.

5 Dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 preferentemente comprende un residuo de cisteína en (unido a) el extremo C-terminal y/o N-terminal.

La provisión de un residuo de cisteína en el extremo N-terminal y/o C-terminal de un péptido puede facilitar su conjugación con un portador, por ejemplo, y/o puede incrementar la inmunogenicidad del péptido.

10 Según una forma de realización preferida de la presente invención, dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 (es decir, los dos o más péptidos derivados de PCSK9) se acoplan, individualmente o en combinación, con un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana).

15 Según una forma de realización preferida de la presente invención, dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 se acoplan con un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana), toxoide tetánico, proteína de unión a albúmina, antígeno nuclear de la hepatitis B, albúmina de suero bovino, un dendrímero (MAP), conectores peptídicos (o regiones flanqueantes), así como las sustancias adyuvantes descritos en Singh *et al.*, Nat. Biotech. 17:1075-1081, 1999, 1075-1081 (en particular los de la tabla 1 de dicho documento), y O'Hagan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735 (en particular los compuestos  
20 inmunopotenciadores endógenos y sistemas de administración descritos en la misma) o mezclas de los mismos. La reacción de conjugación (por ejemplo mediante compuestos heterobifuncionales tales como GMBS y evidentemente también otros, tal como se indica en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson) en el presente contexto puede seleccionarse de entre reacciones conocidas por el experto en la materia. Además, la composición de vacuna puede formularse con un adyuvante, preferentemente una composición de aluminio de baja solubilidad, en particular  
25 hidróxido de aluminio. Evidentemente, también pueden utilizarse adyuvantes tales como fosfato de aluminio MF59, fosfato de calcio, citoquinas (por ejemplo IL-2, IL-12, GM-CSF), saponinas (por ejemplo QS21), derivados de MDP, oligonucleótidos CpG, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (por ejemplo de Freund, SAF), liposomas, lipopéptidos, virosomas, iscomas, cocleatos, micropartículas de PLG, partículas de poloxámero, partículas de tipo vírico, enterotoxina termolábil (ET), toxina del cólera (TC), toxinas mutantes (por ejemplo LTK63 y LTR72), micropartículas  
30 y/o liposomas polimerizados.

Los péptidos de la presente invención preferentemente se encuentran unidos al portador o adyuvante mediante un conector, que se selecciona de entre el grupo que consiste en NHS-poli(óxido de etileno) (PEO) (por ejemplo  
35 NHS-PEO<sub>4</sub>-maleimida).

Una vacuna que comprende un péptido de la presente invención y el portador farmacéuticamente aceptable puede administrarse mediante cualquier modo de aplicación adecuado, por ejemplo por vía intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intranasal, oral, subcutánea (s.c.), etc., y en cualquier dispositivo de administración adecuado (O'Hagan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2(9):727-735, 2003). El compuesto de la  
40 presente invención preferentemente se formula para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular. Los métodos y métodos para obtener las formulaciones respectivas son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc., 2004).

De esta manera, la vacuna según la presente invención comprende por lo menos dos péptidos que preferentemente se formulan para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular.  
45

Dichos por lo menos dos péptidos/fragmentos en la vacuna de la presente invención preferentemente se formulan con un adyuvante, preferentemente hidróxido de aluminio.

50 Según una forma de realización preferida de la presente invención, la vacuna se utiliza en el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular, enfermedades vasculares periféricas, enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria o ataque cerebral apopléjico.

Tal como se ha indicado de manera general, los péptidos anteriormente indicados y las combinaciones de los mismos pueden inducir la formación de anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a PCSK9. La interacción de los anticuerpos con PCSK9 conduce al incremento del receptor de la lipoproteína de baja densidad en los hepatocitos del hígado *in vivo* y la posterior reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total.  
55

La enfermedad asociada a la aterosclerosis preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria, ataque cerebral apopléjico y accidente cerebrovascular.  
60

Las expresiones "enfermedades asociada a hiperlipemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" y "trastornos causados por hiperlipemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" se refieren a enfermedades que son una consecuencia de la hiperlipemia, la hipercolesterolemia y la aterosclerosis. Entre estas enfermedades se incluyen entre otras la enfermedad oclusiva arterial periférica, la enfermedad cardíaca coronaria y el insulto cerebral  
65

apopléctico (ver, por ejemplo, Steinberg D., J. Lipid Res. 46:179-190, 2005, y Steinberg D., J. Lipid Res. 47:1339-1351, 2006).

5 Según una forma de realización preferida de la presente invención los dos o más fragmentos de PCSK9 se administran en el individuo en una cantidad de entre 0,1 ng y 10 mg, preferentemente de entre 0,5 y 500 µg, más preferentemente de entre 1 y 500 µg, todavía más preferentemente de entre 1 y 100 µg, en cada inmunización. En una forma de realización preferente, dichas cantidades se refieren a la totalidad de los fragmentos de PCSK9 presentes en la vacuna. En otra forma de realización preferente, dichas cantidades se refieren a cada fragmento individual presente en la vacuna. Evidentemente resulta posible proporcionar una vacuna en la que los fragmentos  
10 específicos de PCSK9 se encuentren presentes en cantidades diferentes o iguales. Sin embargo, el péptido de la presente invención puede administrarse alternativamente en un individuo en una cantidad de entre 0,1 ng y 10 mg, preferentemente de entre 10 ng y 1 mg, en particular de entre 100 ng y 300 µg/kg de peso corporal.

15 La cantidad de péptidos que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de administración individual variará según el huésped tratado y el modo de administración particular. La dosis de la vacuna puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo de inducir una respuesta deseada en el individuo. El régimen de administración puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación  
20 terapéutica. La dosis de la vacuna también puede modificarse para proporcionar una respuesta de dosis preventiva óptima según las circunstancias. Por ejemplo, los péptidos y la vacuna de la presente invención pueden administrarse en el individuo a intervalos de varios días, una o dos semanas o incluso meses o años en todo caso dependiendo del nivel de anticuerpos dirigidos a PCSK9.

25 En una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido/vacuna se aplica entre 2 y 10, preferentemente entre 2 y 7, todavía más preferentemente hasta 5 y todavía más preferentemente hasta 4 veces. Este número de inmunizaciones puede conducir a una inmunización básica. En una forma de realización particularmente preferida, el intervalo de tiempo entre las vacunaciones sucesivas se selecciona para que sea de entre 2 semanas y 5 años, preferentemente de entre 1 mes y hasta 3 años, más preferentemente de entre 2 meses  
30 y 1,5 años. Un programa de vacunación ejemplificado puede comprender entre 3 y 4 vacunaciones iniciales durante un periodo de entre 6 y 8 semanas y de hasta 6 meses. Después, la vacunación puede repetirse cada dos a diez años. La administración repetida del péptido/vacuna de la presente invención puede maximizar el efecto final de una vacunación terapéutica.

35 La vacuna de la presente invención puede comprender además antígenos derivados de otras proteínas que también participan en la regulación de los niveles de LDL y/o HDL dentro del cuerpo humano. Por ejemplo, los fragmentos de PCSK9 de la presente invención pueden combinarse con epítopos derivados de la proteína PTEC humana.

40 Típicamente, la vacuna contiene los péptidos de la presente invención en una cantidad de entre 0,5 y 500 µg, preferentemente de entre 1 y 100 µg y alternativamente de entre 0,1 ng y 10 mg, preferentemente de entre 10 ng y 1 mg, en particular de entre 100 ng y 100 µg, o, alternativamente, por ejemplo, de entre 100 fmoles y 10 µmoles, preferentemente de entre 10 pmoles y 1 µmol, en particular de entre 100 pmoles y 100 nmoles. Típicamente, la vacuna puede contener además sustancias auxiliares, por ejemplo tampones, estabilizadores, etc.

45 Según una forma de realización preferida de la presente invención, se refiere a la utilización de dos o más péptidos. Según la presente invención para la preparación de una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la aterosclerosis y enfermedades asociadas a la aterosclerosis, en la que la enfermedad asociada a la aterosclerosis se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad  
50 cardiaca coronaria, ataque cerebral apopléjico y accidente cerebrovascular.

Además de la vacuna de la presente invención, el individuo que debe ser tratado puede recibir también otros ingredientes activos que es conocido que influyen sobre los niveles de LDL y/o HDL en el ser humano y en los mamíferos, tales como estatinas, fibras, ácido nicotínico, inhibidor de la incorporación del colesterol (por ejemplo ezetimibe), ApoA1 Milano, HDL deslipidado o esteroides vegetales. Resulta particularmente preferido administrar en  
55 el individuo la vacuna de la presente invención conjuntamente (es decir, simultáneamente, consecutivamente, etc.) con estatinas.

La presente invención se ilustra adicionalmente en las figuras y ejemplos, a continuación, sin encontrarse limitada a los mismos.

60 La figura 1 muestra la cantidad de receptor de lipoproteína de baja densidad en lisados hepáticos para péptidos con el SEC ID nº 1 (control de péptido irrelevante), nº 4, nº 5, nº 6, nº 7 y nº 8 y la combinación A (SEC ID nº 4 y nº 7), B (SEC ID nº 5 y nº 7), C (SEC ID nº 5 y nº 8) y D (SEC ID nº 6 y nº 8) en comparación con los animales de control.

65 La figura 2 muestra el porcentaje de reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total (n=5 ratones por grupo) para los péptidos con la secuencia ID nº 1 (control de péptido irrelevante), nº 4, nº 5, nº 6, nº 7 y nº 8, y la

combinación A (SEC ID nº 4 y nº 7), B (SEC ID nº 5 y nº 7), C (SEC ID nº 5 y nº 8) y D (SEC ID nº 6 y nº 8).

**Ejemplos:**

5 Materiales y métodos

Vacuna:

10 Los péptidos se conjugaron mediante el conector heterobifuncional GMBS (N-hidroxisuccinimida éster de ácido 4-maleimidobutírico) a HLA (hemocianina de lapa americana).

Se suspendieron 15 µg de los péptidos en hidróxido de aluminio (concentración final de hidróxido de aluminio: 0,2%). Como tampón se utilizó fosfato.

15 Tabla 1. Secuencias utilizadas para la producción de vacuna

	Secuencia de aminoácidos	Información de secuencia
SEC ID nº 1	RPETWIPNRSPIL	Irrelevante (grupo de control)
SEC ID nº 2	SIPWNLERITPPR	aa 153-165 de SEC ID nº 9
SEC ID nº 3	PEEDGTRFHRQASK	aa 209-222 de SEC ID nº 9
SEC ID nº 4	PEEDGTRFHRQA	aa 209-220 de SEC ID nº 9
SEC ID nº 5	EEDGTRFHRQASK	aa 210-222 de SEC ID nº 9
SEC ID nº 6	EEDGTRFHRQAS	aa 210-221 de SEC ID nº 9
SEC ID nº 7	SIPWNLERITP	aa 153-163 de SEC ID nº 9
SEC ID nº 8	SIPWNLERIT	aa 153-162 de SEC ID nº 9
Combinación A (SEC ID nº 4 y nº 7)	PEEDGTRFHRQA + SIPWNLERITP	aa 209-220 + aa 153-163 de SEC ID nº 9
Combinación B (SEC ID nº 5 y nº 7)	EEDGTRFHRQASK + SIPWNLERITP	aa 210-222 + aa 153-163 de SEC ID nº 9
Combinación C (SEC ID nº 5 y nº 8)	EEDGTRFHRQASK + SIPWNLERIT	aa 210-222 + aa 153-162 de SEC ID nº 9
Combinación D (SEC ID nº 6 y nº 8)	EEDGTRFHRQAS + SIPWNLERIT	aa 210-221 + aa 153-162 de SEC ID nº 9

Experimentos animales:

20 Se inmunizaron por vía subcutánea 5 ratones Balb/c. Los ratones disponían de acceso a alimentos y agua *ad libitum* y se mantuvieron bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad. La edad de los ratones al inicio de los experimentos habitualmente era de 8 a 10 semanas.

25 Los ratones recibieron cuatro inyecciones a intervalos de 2 semanas con 15 µg de péptido neto acoplado con HLA y adsorbido en alúmina como adyuvante en un volumen de 1 ml en total mediante la vía s.c.

Se extrajo sangre aproximadamente 2 semanas después de la inyección final.

ELISA de proteínas:

30 Para determinar la inmunogenicidad de las vacunas, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc-Maxisorb con proteína PCSK9 humana recombinante. Se bloqueó la unión no específica mediante incubación con tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS). Se añadieron diluciones apropiadas de suero a los pocillos diluidas en serie 1:2 veces y se incubaron durante aproximadamente 1 hora a 37°C. En cada placa de ELISA se incluyó un suero estándar a modo de control interno. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con IgG de cabra antiratón biotinilado, seguido de peroxidasa de rábano picante acoplada a estreptavidina. Como sustrato se añadió ABTS y se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en un lector de placas de micropocillos. A modo de control negativo se analizaron sueros del grupo de control a los que se había inyectado un péptido irrelevante. Se definieron los valores como la dilución del suero en la que se alcanzaba el 50% de la D<sub>0max</sub> en el ensayo.

40 Ensayo de colesterol total

Se midió el colesterol total con el kit de colesterol WAKO LabAssay™ (Wako).

45 ELISA de tipo sándwich de RLDL

Para determinar los niveles de receptor de lipoproteína de baja densidad (RLDL) en hígado murino, se sacrificaron los ratones 2 semanas después de la última vacunación. Se aisló el tejido hepático y se llevó a cabo la extracción de

las proteínas siguiendo protocolos estándares.

5 Se recubrieron placas Nunc-Maxisorb de 96 pocillos con anticuerpo policlonal de cabra anti-RLDL purificado por afinidad para RLDL de ratón (R&D Systems). Se bloqueó la unión no específica mediante incubación con BSA/PBS al 1%. A continuación, los lisados hepáticos se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente para capturar el RLDL murino. La detección del RLDL capturado se llevó a cabo con anticuerpo policlonal de pollo anti-RLDL (Abcam), seguido de la incubación con un anticuerpo secundario de cabra biotinilado anti-IgG de pollo (Southern Biotech) y con un conjugado de estreptavidina-HRP. Finalmente, se utilizó TMB como sustrato cromógeno de peroxidasa.

10 La cuantificación del receptor de lipoproteína de baja densidad se llevó a cabo mediante comparación con una curva de calibración de estándares y se normalizó frente a la concentración de proteínas totales de los lisados.

15 El grupo de control (vacunación de control con péptido irrelevante) se fijó en 100% y se compararon los niveles de los grupos tratados con vacunas anti-PCSK9 a dicho grupo de control.

**Ejemplo 1.** Medianas de valores de proteína contra PCSK9 humano (n=5 ratones en cada grupo).

ID de secuencia	Mediana de valor de proteína (DO <sub>max</sub> /2)
sec 1 control	0
sec 4	45.000
sec 7	47.000
sec 5	14.000
sec 7	47.000
sec 5	14.000
sec 8	31.000
sec 6	13.000
sec 8	31.000

**Ejemplo 2.** Valores medios en mg/dl y porcentaje de reducción del colesterol total (n=5 ratones en cada grupo).

20

ID de secuencia	Valores medios (mg/dl)	Stdv	% de reducción de CT en comparación con el grupo de control	
sec 1 control	98	9		
sec 4	88	12	10	
sec 7	78	4	20	
Combinación A	sec 4 + 7	71	5	28
sec 1 control	86	9		
sec 5	61	7	29	
sec 7	64	5	26	
Combinación B	sec 5 + 7	51	1	41
sec 1 control	83	7		
sec 5	60	8	28	
sec 8	55	3	34	
Combinación C	sec 5 + 8	47	7	43
sec 1 control	83	7		
sec 6	65	4	22	
sec 8	55	3	34	
Combinación D	sec 6 + 8	48	4	42



ES 2 565 757 T3

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 3

10 Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 4

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala  
 1 5 10

25 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 5

Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys  
 1 5 10

35 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 6

Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser  
 1 5 10

45 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 7

Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro  
 1 5 10

55 <210> 8

# ES 2 565 757 T3

<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> fragmento de PCSK9

<400> 8

10 **Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr**  
**1 5 10**

<210> 9  
<211> 692  
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 565 757 T3

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

ES 2 565 757 T3

	195		200		205														
Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Thr	Arg	Phe	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Lys	Cys	Asp				
	210					215					220								
Ser	His	Gly	Thr	His	Leu	Ala	Gly	Val	Val	Ser	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly				
225					230					235					240				
Val	Ala	Lys	Gly	Ala	Ser	Met	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Asn	Cys	Gln				
				245					250					255					
Gly	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile	Arg				
			260					265					270						
Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Gln	Pro	Val	Gly	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Pro				
		275					280					285							
Leu	Ala	Gly	Gly	Tyr	Ser	Arg	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Cys	Gln	Arg	Leu				
	290					295					300								
Ala	Arg	Ala	Gly	Val	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asn	Phe	Arg	Asp				
305					310					315					320				
Asp	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Val				
				325					330					335					
Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Gln	Asp	Gln	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Gly				
			340					345					350						
Thr	Asn	Phe	Gly	Arg	Cys	Val	Asp	Leu	Phe	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ile				
		355					360					365							
Ile	Gly	Ala	Ser	Ser	Asp	Cys	Ser	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Gln	Ser	Gly				
	370					375					380								
Thr	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	His	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Met	Met	Leu				
385					390					395					400				
Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ile				
				405					410					415					
His	Phe	Ser	Ala	Lys	Asp	Val	Ile	Asn	Glu	Ala	Trp	Phe	Pro	Glu	Asp				
			420					425					430						
n	Arg	Val	Leu	Thr	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr				

ES 2 565 757 T3

	435						440										445
His	Gly	Ala	Gly	Trp	Gln	Leu	Phe	Cys	Arg	Thr	Val	Trp	Ser	Ala	His		
	450					455					460						
Ser	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Cys	Ala	Pro	Asp		
465					470					475					480		
Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Cys	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Arg	Arg		
				485						490				495			
Gly	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Lys	Leu	Val	Cys	Arg	Ala	His		
			500					505					510				
Asn	Ala	Phe	Gly	Gly	Glu	Gly	Val	Tyr	Ala	Ile	Ala	Arg	Cys	Cys	Leu		
		515					520					525					
Leu	Pro	Gln	Ala	Asn	Cys	Ser	Val	His	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Glu	Ala		
	530					535					540						
Ser	Met	Gly	Thr	Arg	Val	His	Cys	His	Gln	Gln	Gly	His	Val	Leu	Thr		
545					550					555					560		
Gly	Cys	Ser	Ser	His	Trp	Glu	Val	Glu	Asp	Leu	Gly	Thr	His	Lys	Pro		
				565					570					575			
Pro	Val	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Asn	Gln	Cys	Val	Gly	His	Arg		
			580					585					590				
Glu	Ala	Ser	Ile	His	Ala	Ser	Cys	Cys	His	Ala	Pro	Gly	Leu	Glu	Cys		
		595					600					605					
Lys	Val	Lys	Glu	His	Gly	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln	Glu	Gln	Val	Thr	Val		
	610					615					620						
Ala	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	Thr	Leu	Thr	Gly	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly		
625					630					635					640		
Thr	Ser	His	Val	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ala	Val	Asp	Asn	Thr	Cys	Val	Val		
				645					650					655			
Arg	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val		
			660					665					670				
r	Ala	Val	Ala	Ile	Cys	Cys	Arg	Ser	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Ala	Ser		

675

680

685

**Gln Glu Leu Gln**  
690

5 <210> 10  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> fragmento de PCSK9  
<400> 10

**Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
1 5 10 15

**Tyr Arg Ala Asp**  
20

15 <210> 11  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> fragmento de PCSK9  
<400> 11

**Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
1 5 10 15

**Tyr Arg Ala**

25 <210> 12  
<211> 18  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> fragmento de PCSK9  
35 <400> 12

**Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
1 5 10 15

**Tyr Arg**

40 <210> 13  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> fragmento de PCSK9

ES 2 565 757 T3

<400> 13

**Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
**1 5 10 15**

**Tyr**

5 <210> 14  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> fragmento de PCSK9

<400> 14

**Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
**1 5 10 15**

15 <210> 15  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> fragmento de PCSK9

25 <400> 15

**Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro**  
**1 5 10 15**

30 <210> 16  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> fragmento de PCSK9

<400> 16

**Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr**  
**1 5 10 15**

40 <210> 17  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> fragmento de PCSK9

<400> 17

50 **Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg**  
**1 5 10 15**

**Ala Asp**

ES 2 565 757 T3

<210> 18  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmento de PCSK9

10 <400> 18

**Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala**  
 1 5 10 15

**Asp**

<210> 19  
 15 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> fragmento de PCSK9

<400> 19

**Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr**  
 1 5 10 15

**Arg Ala**

25 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9

<400> 20

35 **Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg**  
 1 5 10 15

**Ala**

<210> 21  
 40 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmento de PCSK9

45 <400> 21

**Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala**  
 1 5 10 15

50 <210> 22

ES 2 565 757 T3

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 22

**Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr**  
**1 5 10 15**

10 **Arg**

<210> 23  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmento de PCSK9

20 <400> 23

**n Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg**

<210> 24  
 25 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> fragmento de PCSK9

<400> 24

**Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg**  
**1 5 10 15**

35 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmento de PCSK9

<400> 25

45 **Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr**  
**1 5 10 15**

<210> 26  
 50 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> fragmento de PCSK9

55 <400> 26

ES 2 565 757 T3

**Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr**  
**1 5 10**

5 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 27

**Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
**1 5 10 15**

15 <210> 28  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 28

**Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg**  
**1 5 10**

30 <210> 29  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 29

**Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro**  
**1 5 10**

40 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> fragmento de PCSK9  
 <400> 30

**Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser**  
**1 5 10 15**

**Lys Cys Asp Ser**  
**20**

50 <210> 31  
 <211> 19  
 <212> PRT

ES 2 565 757 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de PCSK9

5

<400> 31

**Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser**  
**1 5 10 15**

**Aa Cys Asp**

10

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> fragmento de PCSK9

<400> 32

**Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser**  
**1 5 10 15**

**Lys Cys**

20

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de PCSK9

30

<400> 33

**Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser**  
**1 5 10 15**

**Lys**

35

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> fragmento de PCSK9

<400> 34

**Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys**  
**1 5 10 15**

**Cys Asp Ser**

45

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

ES 2 565 757 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de PCSK9

5

<400> 35

Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys  
1 5 10 15

**Asp Ser**

10 <210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> fragmento de PCSK9

<400> 36

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp  
1 5 10 15

**Ser**

20

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de PCSK9

30 <400> 37

Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys  
1 5 10 15

**Cys Asp**

35 <210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> fragmento de PCSK9

<400> 38

Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys  
1 5 10 15

**Asp**

45

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

ES 2 565 757 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de PCSK9

5

<400> 39

**Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp**  
**1 5 10 15**

10

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> fragmento de PCSK9

<400> 40

**Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys**  
**1 5 10 15**

20

**Cys**

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de PCSK9

30

<400> 41

**Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys**  
**1 5 10 15**

35

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> fragmento de PCSK9

<400> 42

**Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys**  
**1 5 10 15**

45

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> fragmento de PCSK9

ES 2 565 757 T3

<400> 43

Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys  
1 5 10 15

5 <210> 44  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> fragmento de PCSK9

<400> 44

Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys  
1 5 10 15

15 <210> 45  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> fragmento de PCSK9

25 <400> 45

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser  
1 5 10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende por lo menos dos fragmentos de proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9), en la que por lo menos un fragmento de dichos por lo menos dos fragmentos comprende por lo menos 8 residuos aminoácidos consecutivos de los residuos aminoácidos 150 a 170 de PCSK9 según el SEC ID nº 9 y en la que por lo menos un fragmento de dichos por lo menos dos fragmentos comprende por lo menos 8 residuos aminoácidos consecutivos 205 a 225 de PCSK9 según el SEC ID nº 9.
- 10 2. Vacuna según la reivindicación 1, caracterizada por que dichos por lo menos dos fragmentos se seleccionan de entre el grupo que consiste en péptidos que presentan la secuencia de aminoácidos SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2), PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5), EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6), SIPWNLERITP (SEC ID nº 7) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8).
- 15 3. Vacuna según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que por lo menos un fragmento de PCSK9 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2), SIPWNLERITP (SEC ID nº 7) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8) y por lo menos un fragmento de PCSK9 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6).
- 20 4. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la vacuna comprende SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3), SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4), SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5), SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2) y EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6), PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 3) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 8),
- 25 PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 4) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 7), PEEDGTRFHRQA (SEC ID nº 4) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7), EEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 5) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8), EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6) y SIPWNLERITP (SEC ID nº 7) o EEDGTRFHRQAS (SEC ID nº 6) y SIPWNLERIT (SEC ID nº 8).
- 30 5. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 comprenden un residuo de cisteína en el extremo C-terminal y/o N-terminal.
- 35 6. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 están acoplados a un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana).
7. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 se formulan para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular.
- 40 8. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que la vacuna comprende por lo menos un adyuvante, preferentemente hidróxido de aluminio.
- 45 9. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular, enfermedades vasculares periféricas, enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria o ataque cerebral apopléjico.
10. Vacuna según la reivindicación 9, caracterizada por que dichos por lo menos dos fragmentos de PCSK9 se administran en una cantidad de 0,1 ng a 10 mg, preferentemente 1 µg a 500 µg por dosis a un individuo.

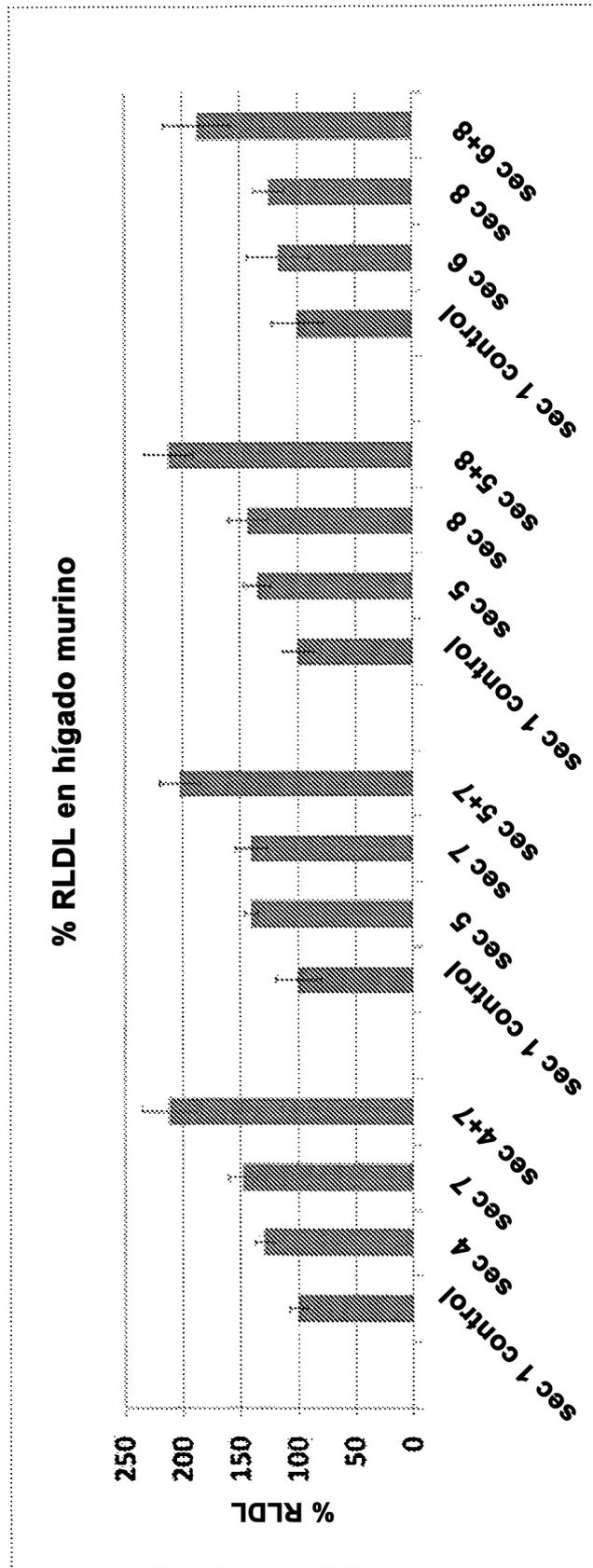


Figura 1

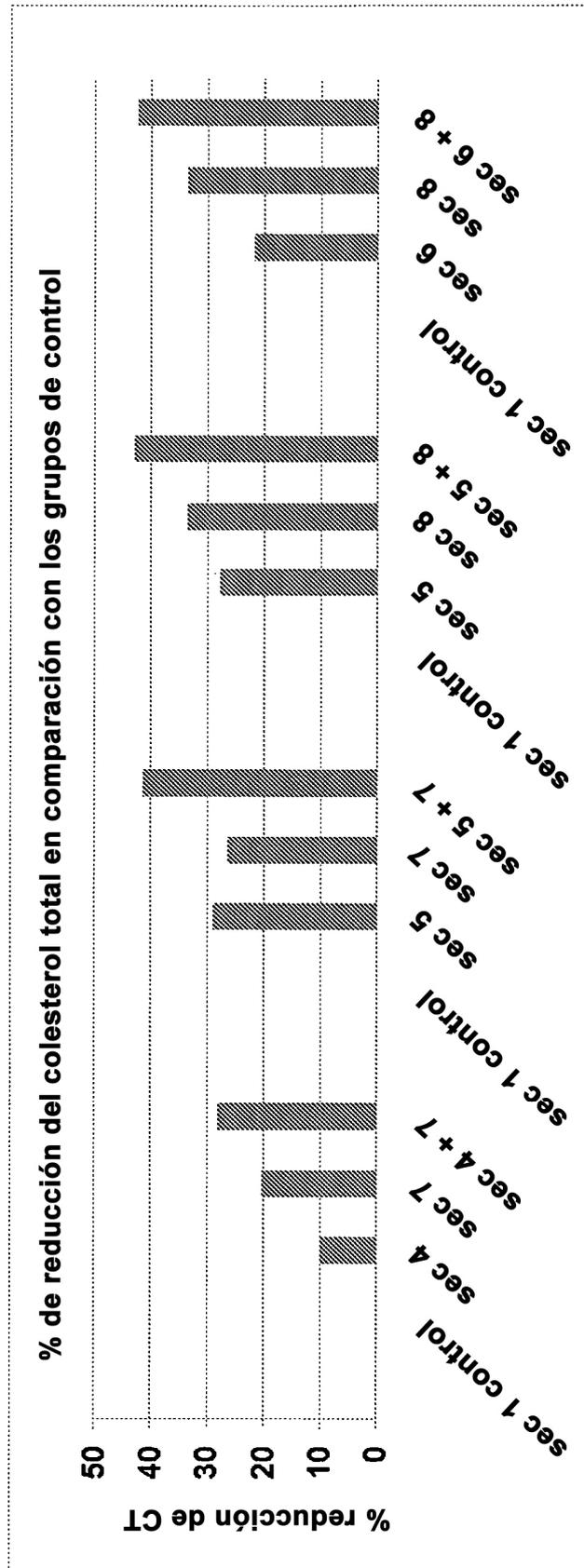


Figura 2