

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 796**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/EP2012/067950**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO2013037889**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12759427 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2755678**

54 Título: **Vacuna de PCSK9**

30 Prioridad:

**13.09.2011 EP 11181090**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.06.2017**

73 Titular/es:

**AFFIRIS AG (100.0%)  
Karl-Farkas-Gasse 22  
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**BRUNNER, SYLVIA;  
GALABOVA, GERGANNA;  
WANKO, BETTINA;  
WINDWARDER, MARKUS;  
WINSAUER, GABRIELE;  
JUNO, CLAUDIA y  
STAFFLER, GÜNTHER**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 618 796 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 hiperlipidemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis.

10 La hiperlipidemia, 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 esteroil (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 WO 2011/027257 se refiere a unos fragmentos inmunógenos derivados de PCSK9 que pueden ser

utilizados en una vacuna para el tratamiento, la prevención y el alivio de los trastornos mediados por PCSK9.

En el documento WO 2009/100297 son divulgados unos antagonistas de PCSK9 humana.

5 El documento WO 2010/057242 se refiere a vacunas que comprenden péptidos derivados de un fragmento de PCSK9 humana.

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.

15 Dicho objetivo se consigue con una vacuna que comprende por lo menos dos fragmentos de proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9), en la que un primer fragmento de dichos por lo menos dos fragmentos comprende por lo menos 9 residuos aminoácidos consecutivos de los residuos aminoácidos 153 a 165 y un segundo fragmento de dichos por lo menos dos fragmentos comprende por lo menos 9 residuos aminoácidos consecutivos de los residuos aminoácidos 209 a 222 de PCSK9 (SEC ID nº 9).

20 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 hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis con una eficiencia y exactitud mucho más altas que con la administración de péptidos individuales.

25 Los fragmentos peptídicos utilizados en la vacuna de la presente invención comprenden por lo menos 9, más preferentemente por lo menos 10, residuos aminoácidos consecutivos de los residuos aminoácidos 153 a 165, y de los residuos aminoácidos 209 a 222, de PCSK9 (SEC ID nº 9).

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

```
MGTVSSRRSW WPLPLLLLLL LLLGPAGARA QEDEDGDYEE LVLALRSEED GLAEAPEHGT TATFHRCARD
PWRLPGTYVV VLKEETHLSQ SERTARRLQA QAARRGYLTK ILHVFHGLLP GFLVKMSGDL LELALKLPHV
DYIEEDSSVF AQSIPWNLER ITPPRYRADE YQPPDGGSLV EVYLLDTSIQ SDHREIEGRV MVTDFENVPE
EDGTRFHRQA SKCDSHGTHL AGVVSGRDAG VAKGASMRSL RVLNCQKGT VSGTLIGLEF IRKSQLVQPV
GPLVVLLPLA GGYSRVLNAA CQLARAGVV LVTAAGNFRD DACLYSPASA PEVITVGATN AQDQPVTLGT
LGTNFGRCVD LFAPGEDIIG ASSDCSTCFV SQSGTSQAAA HVAGIAAMML SAPELTLAE LRQRLIHFS
KDVINEAWFP EDQRVLTPLN VAALPPSTHG AGWQLFCRTV WSAHSGPTRM ATAVARCAPD EELLSCSSFS
RSGKRRGERM EAQGGKLVCR AHNAFGGEGV YAIARCCLLP QANCSVHTAP PAEASMGTRV HCHQQGHVLT
GCSHWVEVED LGTHKPPVLR PRGQPNQCVG HREASIHASC CHAPGLECKV KEHGIPAPQE QVTVACEEGW
TLTGCSALPG TSHVLGAYAV DNTCVVRSRD VSTGTSTSEG 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.

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 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).

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), FAWSSIPWNLERITPPRYR (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), ENVPEEDGTRFHRQASKCD (SEC ID nº 31), 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.

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.

5 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).

10 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, alúmina 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 inmunopotenciadores endógenos y sistemas de administración descritos en la misma) o mezclas de los mismos. La  
15 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 hidróxido de aluminio. Evidentemente, también pueden utilizarse adyuvantes tales como fosfato de aluminio MF59,  
20 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 y/o liposomas polimerizados.

25 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 NHS-PEO<sub>4</sub>-maleimida).

30 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 presente invención preferentemente se formula para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular. Los  
35 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.

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

45 Según una forma de realización preferida de la presente invención, la vacuna se utiliza en el tratamiento y/o prevención de trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular o enfermedades vasculares periféricas.

50 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 asociadas a hiper lipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" y "trastornos causados por hiper lipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" se refieren a enfermedades que son una consecuencia de la hiper lipidemia, 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 apopléjico (ver, por ejemplo, Steinberg D., J. Lipid Res. 46:179-190, 2005, y Steinberg D., J. Lipid Res. 47:1339-1351, 2006).

65 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 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 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.

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 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.

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 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.

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.

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.

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 preferentemente de entre el grupo que consiste en enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria, ataque cerebral apopléjico y accidente cerebrovascular.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un individuo que padece o se encuentra en riesgo de padecer aterosclerosis o una enfermedad asociada con la aterosclerosis en cuyo curso es administrado/a a dicho individuo un péptido o una vacuna según la presente invención.

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 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.

La figura 1 muestra la cantidad de receptor de lipoproteína de baja densidad en lisados hepáticos para péptidos con la 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.

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:**

Materiales y métodos

Vacuna:

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.

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:

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.

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:

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 DO<sub>max</sub> en el ensayo.

Ensayo de colesterol total

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

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.

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.

15 **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).

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

20 **Ejemplo 3.** Cantidad de receptor de lipoproteína de baja densidad en hígado de ratón *in vivo* (n=5 ratones en cada grupo), en comparación con el grupo de control.

ID de secuencia	% de RLDL	Stdv
sec 1 control	100	8
sec 4	130	8
sec 7	148	12
Combinación A sec 4 + 7	212	24

# ES 2 618 796 T3

	ID de secuencia	% de RLDL	Stdv
Combinación B	sec 1 control	100	19
	sec 5	140	6
	sec 7	140	14
	sec 5 + 7	202	18
Combinación C	sec 1 control	100	13
	sec 5	135	12
	sec 8	143	17
	sec 5 + 8	212	21
Combinación D	sec 1 control	100	22
	sec 6	116	27
	sec 8	125	14
	sec 6 + 8	187	30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende por lo menos dos fragmentos de proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9), en la que un primer fragmento de dichos por lo menos dos fragmentos comprende por lo menos 9 residuos aminoácidos consecutivos de los residuos aminoácidos 153 a 165 de PCSK9 según la SEC ID nº 9 y un segundo fragmento de dichos por lo menos dos fragmentos comprende por lo menos 9 residuos aminoácidos consecutivos de los residuos aminoácidos 209 a 222 de PCSK9 según la SEC ID nº 9.
- 10 2. Vacuna según la reivindicación 1, en la 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, en la 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, en la 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), PEEDGTRFHRQA (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).
- 25 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.
- 30 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).
- 35 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, enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria, ataque cerebral apopléjico o enfermedades vasculares periféricas.
10. Vacuna para la utilización 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.

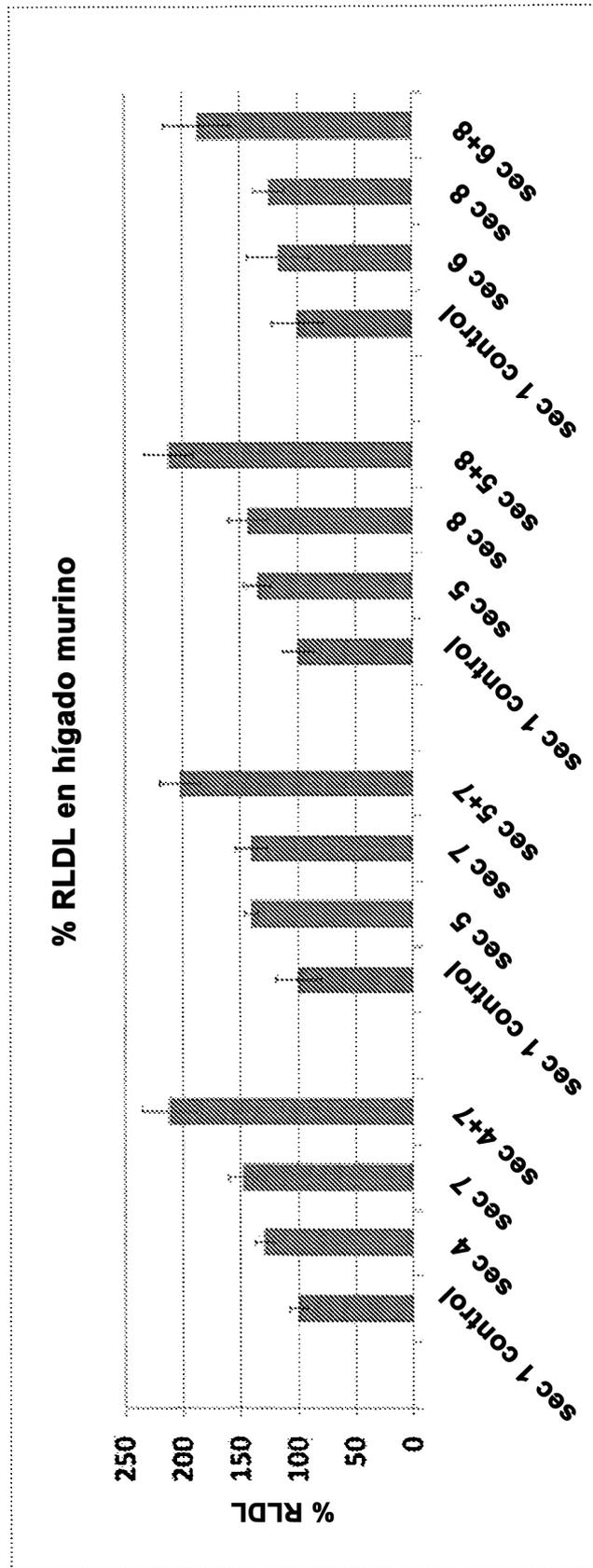


Figura 1

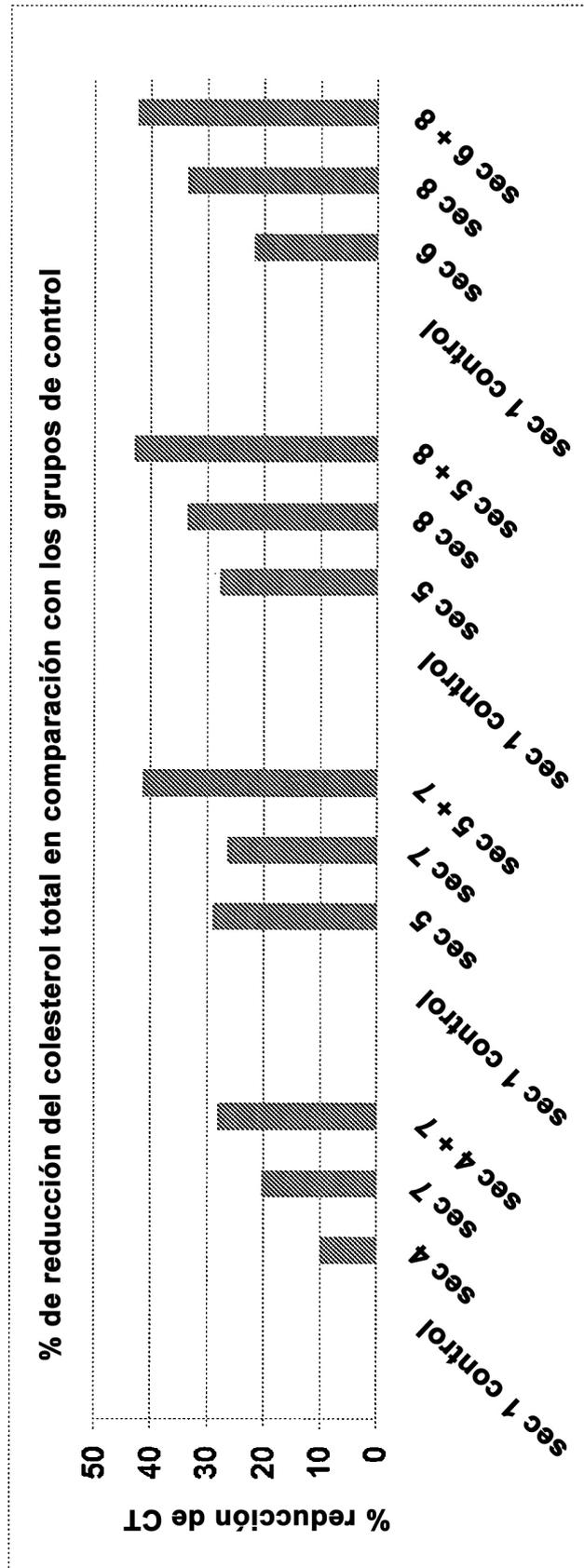


Figura 2