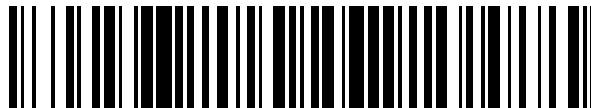


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 138**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2013 PCT/EP2013/060618**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13724587 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2852614**

54 Título: **Vacuna basada en el componente de complemento C5A**

30 Prioridad:

23.05.2012 EP 12169088

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

19.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STAFFLER, GÜNTHER;
LANDLINGER, CHRISTINE y
MATTNER, FRANK**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 647 138 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 basada en el componente de complemento C5A.

5 La presente invención se refiere a un medicamento destinado a la utilización en los campos de la medicina, la inmunología y la biología molecular en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas inducidas por el componente de complemento C5a.

10 El complemento es un componente clave del sistema inmunitario innato, que protege al huésped frente a los microorganismos, tales como virus, bacterias y otras células foráneas y anormales. Sin embargo, la activación inapropiada o excesiva del sistema del complemento puede conducir a capacidades destructoras contra el huésped mismo. La activación del complemento incontrolada se encuentra implicada en varias enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la degeneración macular asociada a la edad, la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso, el
15 síndrome antifosfolípido, el asma, la vasculitis, la aterosclerosis, la esclerosis múltiple, la dermatitis inflamatoria, tal como la soriasis y la urticaria crónica, el síndrome de Guillain-Barre y el síndrome urémico hemolítico.

La activación del complemento incontrolada también puede producirse en el cáncer, en complicaciones del embarazo, tales como la preeclampsia y el síndrome antifosfolípido, y bajo condiciones patológicas agudas, incluyendo la sepsis, la lesión pulmonar aguda, el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS) y la lesión por isquemia-reperfusión. También se observa una activación masiva del complemento sobre superficies artificiales, conduciendo a la trombosis asociada a la hemodiálisis.

25 Muchos de los efectos tóxicos observados en dichas condiciones son atribuibles a la producción excesiva de la anafilatoxina C5a que induce y perpetúa las reacciones inflamatorias. La función principal de C5a es la quimiotaxis y la activación de los granulocitos, mastocitos y macrófagos que median en la liberación de factores inmunológicos solubles. Por lo tanto, la inhibición o modulación de la actividad del complemento ha sido reconocida como estrategia terapéutica prometedora durante muchos años.

30 La mayoría de proteínas del complemento existen en el plasma en forma de precursores inactivos que se cortan y activan mutuamente en una cascada proteolítica en respuesta a tres mecanismos diferentes: la ruta clásica, la ruta inducida por lectinas y la ruta alternativa. El resultado final de las tres cascadas de activación es la amplificación masiva de la respuesta y la formación de las anafilatoxinas C3a y C5a y el complejo de ataque membranario (MAC) letal para las células, un poro que causa la lisis de las células.

35 El componente C5 del complemento es una proteína de 190 kDa y comprende dos cadenas (α , de 115 kDa, y β , de 75 kDa). La activación de cualquiera de las rutas del complemento puede generar un enzima convertasa de C5 capaz de cortar C5 formando C5b y la potente anafilatoxina C5a. Tras el corte de C5, queda expuesto un neopéptido C-terminal en el fragmento C5a.

40 El fragmento C5a humano es una glucoproteína de 74 aminoácidos de longitud con un peso molecular de 12 a 14,5 kDa. La molécula está compuesta de cuatro hélices α que son estabilizadas por tres puentes disulfuro internos. Una asparagina está localizada en la posición 64, que presenta una fracción carbohidrato unida a N que no resulta esencial para la actividad biológica pero que muy probablemente regula la actividad de C5a *in vivo*. Poco después del corte del fragmento C5a por la convertasa de C5, el residuo arginina en el extremo C-terminal de la proteína C5a de 74 aminoácidos de longitud resulta eliminado por carboxi-peptidasas séricas y de la superficie celular y se forma la molécula C5a desARG, que es menos activa. Ambas formas de la proteína C5a, C5a ARG y C5a desARG, se unen a los siete receptores de dominio transmembrana C5aR (CD88) y el menos caracterizado C5L2 (gpr77), que se expresan ubicuamente en una amplia diversidad de células, pero en particular sobre la superficie de células inmunológicas como los macrófagos, los neutrófilos, los mastocitos y las células T. El sitio de unión a ligando de C5aR es complejo y consiste en por lo menos dos dominios de unión físicamente separables. Uno se une al núcleo unido mediante disulfuro de C5a (aminoácidos 15 a 46), mientras que el segundo se une al extremo carboxi-terminal de C5a (aminoácidos 67 a 74). La afinidad de unión de C5aR para su ligando C5a es muy elevada, con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 nM.

55 Es un objetivo de la presente invención proporcionar medios y procedimientos para el tratamiento de enfermedades o patologías inducidas por el componente C5a del complemento.

60 La presente invención se refiere a una vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en 7 a 19, preferentemente 7 a 14, residuos aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos

$$(X_3)_m KDX_2 QLGX_1$$

$$(SEC ID n^\circ 99),$$

en la que:

65 X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consta de alanina, asparagina, glutamina,

glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, treonina, tirosina y valina,

X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consta de alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, tirosina y valina,

X_3 es $(X_4)_n$ ANIS X_5 (SEC ID nº 100) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consta de 1 a 4, preferentemente 1, 2, 3 o 4, residuos aminoácidos,

X_4 es VVASQLR (SEC ID nº 101) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consta de 1 a 6, preferentemente de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos aminoácidos,

X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consta de alanina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, histidina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina,

m es 0 o 1, y

n es 0 o 1,

en el que dicho péptido o péptidos están acoplados o fusionados a un portador que comprende por lo menos un epítipo de las células T.

La presente invención se refiere a una inmunización activa contra el C5a del propio cuerpo, que se encuentra regulado positivamente en diversas enfermedades inflamatorias crónicas. El neoepítipo en el extremo C-terminal de C5a que se vuelve accesible tras el corte de la molécula de C5 es la diana de inmunización de la presente invención. De esta manera, la generación y funcionamiento del fragmento C5b, que desempeñan un papel importante en las defensas del huésped, no resultan afectados.

En mayor detalle, la presente invención se refiere a una vacuna basada en variantes peptídicas (denominadas variotopos) del epítipo C-terminal de hC5a original acopladas o fusionadas con un portador que comprende por lo menos un epítipo de célula T, en el que los variotopos comprenden por lo menos 1 intercambio de residuo aminoácido respecto de las secuencias C-terminales originales de hC5a.

Los VARIOTOPOS imitan los epítipos de interés sin ser idénticos a los mismos; de esta manera, la ventaja de las vacunas de variotopo es que eluden la autotolerancia de los autoantígenos. Además, la utilización de variotopos alivia el riesgo de efectos secundarios no deseados, los cuales son prevalentes al utilizar autoantígenos.

Los VARIOTOPOS del epítipo C-terminal de hC5a pueden identificarse y seleccionarse utilizando, por ejemplo, el procedimiento de "escaneo de alaninas". La mutagénesis por escaneo de alaninas se refiere a una sustitución sistemática de aminoácidos individuales dentro de una determinada región proteica o peptídica por un residuo de alanina con el fin de determinar el papel funcional de determinadas posiciones. La alanina es el residuo de sustitución de elección debido a que elimina la cadena lateral en el carbono β y no altera la conformación de la cadena principal ni impone efectos electrostáticos o estéricos extremos.

Mediante la utilización de dicha tecnología, pueden identificarse residuos aminoácidos del epítipo C-terminal de hC5a que resultan cruciales o indispensables para la inducción de una respuesta inmunológica humoral contra hC5a. En la etapa siguiente, las posiciones que resultaron ser intercambiables sin perjudicar la inducción de una respuesta inmunológica humoral frente a hC5a pueden sustituirse sistemáticamente por residuos aminoácidos con características diferentes con el fin de determinar VARIOTOPOS que sean capaces de inducir anticuerpos con una actividad inhibidora más elevada o por lo menos igual contra C5a humano que contra el epítipo original. Después, pueden someterse a ensayo combinaciones de dos o tres intercambios de aminoácidos dentro del epítipo C-terminal de hC5a para su inmunogenicidad y actividad funcional. Los VARIOTOPOS que sean capaces de inducir anticuerpos que muestren una actividad inhibidora más elevada o por lo menos igual contra C5a humano que el epítipo C-terminal original son el objetivo de la presente invención.

Inesperadamente resultó que un péptido requería la presencia de por lo menos los residuos de lisina, ácido aspártico, glutamina, leucina y glicina de SEC ID nº 99 en las posiciones 2, 3, 5, 6 y 7, respectivamente, para poder provocar una respuesta inmunológica satisfactoria (figura 1A y 1B). Todavía más inesperadamente es el hecho de que los péptidos con un intercambio de aminoácido en la última posición (X_1 de SEC ID nº 99; X_1 es un residuo de arginina en la región C-terminal de C5a de tipo salvaje, véanse las SEC ID nº 1 a nº 4) eran capaces de inducir una respuesta inmunológica humoral contra la proteína C5a que era significativamente más elevada que la respuesta inmunológica inducida por fragmentos de C5a de tipo salvaje que comprendían la SEC ID nº 1 a nº 4 (figura 1A a 1D). Resulta importante, tal como se ilustra en las figuras 2A a 2D, que la respuesta inmunológica humoral más elevada resultó también en una inhibición significativamente más elevada de la actividad de C5a. También pueden observarse resultados similares en el caso de que los péptidos que contienen un intercambio de aminoácido del residuo M en la 5ª posición desde la última de la región C-terminal de C5a de

tipo salvaje (véanse, por ejemplo, la SEC ID nº 10 o nº 18) o los péptidos que contienen un intercambio de aminoácido del residuo H en la 8ª posición desde la última del epítipo C-terminal de C5a de tipo salvaje (véanse, por ejemplo, SEC nº 7 o nº 17) sean utilizados para la inmunización (figuras 1 y 2). Este inesperado efecto de que los péptidos que resultan de un intercambio de aminoácido de los aminoácidos anteriormente indicados (R, M o H en la última, 5ª desde el final y 8ª desde la última posición del epítipo terminal de C5a de tipo salvaje, respectivamente, véanse las SEC ID nº 1 a nº 4, por ejemplo) presentan la capacidad de inducir una respuesta inmunológica de anticuerpos específica de C5a que es más elevada y más potente que la respuesta inmunológica inducida por fragmentos de C5a de tipo salvaje que comprenden SEC ID nº 1 a nº 4 se ve confirmada por los resultados mostrados en las figuras 3 a 6. En la presente memoria se ilustran péptidos que muestran una capacidad inhibidora de C5a mucho más elevada que el fragmento correspondiente de C5a de tipo salvaje.

Resulta irrelevante para la presente invención en el documento WO 90/09162, se dan a conocer varios péptidos que muestran algunas homología respecto a los fragmentos de C5a de tipo salvaje humano y que se utilizan como agonistas de la actividad de C5a. Sin embargo, los péptidos dados a conocer en dicha referencia se aplicaron como péptidos solubles que no han sido acoplados a una proteína portadora y que, de esta manera, no pueden utilizarse para el propósito de la presente invención ya que no son capaces de inducir la formación de anticuerpos inhibidores de la actividad de C5a. En el Ejemplo 426 del documento WO 90/09162, por ejemplo, se da a conocer un péptido que comprende en la posición 1 un residuo de fenilalanina. En la presente invención pudo demostrarse que dicha sustitución resulta en una actividad inhibidora de C5a significativamente reducida (véase, por ejemplo, la SEC ID nº 54, figura 4).

El documento WO 2006/134125 se refiere a conjugados de antígenos y usos de los mismos; se proporciona una composición que comprende una partícula similar a un virus unida a por lo menos un antígeno de la invención dada a conocer, en la que dicho antígeno de la invención es CCR5 de la invención, gastrina de la invención, CXCR4 de la invención, CETP de la invención o C5a de la invención. Los péptidos utilizados en vista de C5a humana son diferentes a los utilizados en la presente invención y no muestran la característica de la invención.

El péptido o péptidos comprendidos en la vacuna de la presente invención comprenden o constan de 7, preferentemente 8, preferentemente 9, preferentemente 10, preferentemente 11, preferentemente 12, preferentemente 13, preferentemente 14, preferentemente 15, preferentemente 16, preferentemente 17, preferentemente 18 o preferentemente 19 residuos aminoácidos.

Según la presente invención, X_3 es $(X_4)_n$ ANISX₅ (SEC ID nº 100) o un fragmento truncado N-terminal del mismo. En consecuencia, dicho fragmento truncado N-terminal puede constar de ANISX₅ (SEC ID nº 102), NISX₅ (SEC ID nº 103), ISX₅, SX₅ o X₅. Lo anterior implica que la vacuna de la presente invención puede comprender por lo menos un péptido que presentan las secuencias de aminoácidos ANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 104), NISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 105), ISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 106), SX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 107) o X₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 108), en el caso de que $m=1$.

Según la presente invención, X_4 es VVASQLR (SEC ID nº 101) o un fragmento truncado N-terminal del mismo. El fragmento de VVASQLR puede constar de una de las secuencias de aminoácidos siguientes: VASQLR (SEC ID nº 109), ASQLR (SEC ID nº 110), SQLR (SEC ID nº 111), QLR, LR o R. En consecuencia, el péptido o péptidos utilizados en la vacuna de la presente invención pueden presentar una de las secuencias de aminoácidos siguientes: VVASQLRANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 112), VASQLRANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 113), ASQLRANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 114), SQLRANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 115), QLRANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 116), LRSANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 117), o RANISX₅KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 118), en el caso de que m y n sean 1.

La vacuna de la presente invención puede comprender más de un péptido según la SEC ID nº 99. Resulta particularmente preferente que la vacuna comprende por lo menos un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 99. Sin embargo, la vacuna de la presente invención puede comprender además por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4 o incluso por lo menos 5 péptidos que presentan la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 99. Evidentemente también resulta posible combinar el péptido o péptidos de la presente invención con otros péptidos o ingredientes activos que pueden utilizarse para tratar las mismas condiciones que las de la presente invención.

La combinación de péptido/portador resulta importante ya que los péptidos de la presente invención no presentan la capacidad de inducir cantidades relevantes de anticuerpos al inyectarlos sin acoplamiento a un portador. Además, el portador facilita la inducción de una respuesta de anticuerpos duradera. De esta manera, la presente invención de una inmunización activa contra hC5a ofrece ventajas respecto a la utilización de la terapia de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de las enfermedades basadas en C5a. Por lo tanto, pueden evitarse las desventajas de la terapia de anticuerpos monoclonales de C5a, entre ellas la necesidad de infusiones repetidas de grandes cantidades de anticuerpos, las visitas frecuentes al hospital de los pacientes y los elevados costes de producción de los anticuerpos humanizados.

El péptido o péptidos de la presente invención pueden producirse sintéticamente mediante procedimientos de síntesis química que son bien conocidos de la técnica, en forma de un péptido aislado o como parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente, el péptido o péptidos pueden producirse en un microorganismo, tal como bacterias, levaduras u hongos, en células eucarióticas, tales como mamíferos o células de insecto, o en un vector vírico recombinante, tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus del bosque de Simliki, baculovirus, bacteriófagos, virus Sindbis o virus Sendai, que producen el compuesto/péptido que seguidamente se aísla y, si se desea, se purifica adicionalmente. Entre las bacterias adecuadas para producir el compuesto/péptido se incluyen *E. coli*, *B. subtilis* o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar péptidos. Entre los tipos de levadura adecuados para expresar dicho compuesto/péptido se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida* spp., *Pichia pastoris* o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los procedimientos correspondientes son bien conocidos de la técnica. Los procedimientos para aislar y purificar péptidos producidos recombinantemente también son bien conocidos de la técnica 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 del compuesto/péptido, puede generarse un polipéptido de fusión en el que el compuesto/péptido se fusiona traduccionalmente (se une covalentemente) a un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Los polipéptidos heterólogos típicos son la etiqueta His (por ejemplo, His6; 6 residuos de histidina), la etiqueta GST (glutatión-S-transferasa), etc. Los polipéptidos de fusión facilitan no sólo la purificación del compuesto/péptido, sino que también evitan la degradación de dichos compuestos/péptidos durante la purificación. En el caso de que se desee eliminar el polipéptido heterólogo tras la purificación, el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de corte en la unión entre el compuesto/péptido y el polipéptido heterólogo. El sitio de corte consiste en una secuencia de aminoácidos que es cortada con un enzima específico para la secuencia de aminoácidos en el sitio (por ejemplo, las proteasas).

X_1 puede ser un residuo aminoácido alifático no polar, tal como A, G, V, L, M o I; un residuo aminoácido no cargado polar, tal como S, T, N o Q; un residuo aminoácido con carga positiva, tal como K o H; o un residuo aminoácido aromático polar, tal como Y. X_2 puede ser un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de A, M, V, L, I, K, R, H, T e Y. X_5 puede ser un residuo aminoácido alifático no polar, tal como A, M e I; un residuo aminoácido no cargado polar, tal como S, T, N o Q; o un residuo aminoácido cargado, tal como K, R, H o E.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en treonina, glutamina, tirosina, metionina, alanina, glicina y valina.

En una forma de realización preferida adicional de la presente invención, X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina en caso de que m sea 1 y X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, histidina, metionina y treonina, y/o X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en metionina, alanina, lisina y valina.

Según una forma de realización particularmente preferente de la presente invención, m es 1 y X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, metionina y treonina.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en metionina, alanina, lisina y valina.

Según una forma de realización preferida de la presente invención el péptido o péptido se seleccionan de entre el grupo que consiste en ISHKDMQLGA (SEC ID nº 14), ANISHKDMQLGA (SEC ID nº 21), KDMQLGA (SEC ID nº 22), VVASQLRANISHKDMQLGA (SEC ID nº 23), ANISHKDMQLGT (SEC ID nº 24), ANISHKDMQLGQ (SEC ID nº 25), ANISHKDMQLGY (SEC ID nº 26), ANISHKDMQLGM (SEC ID nº 27), ANISHKDMQLGG (SEC ID nº 28), ANISHKDMQLGV (SEC ID nº 29), ANISHKDMQLGK (SEC ID nº 30), ANISHKDMQLGS (SEC ID nº 31), ANISHKDMQLGH (SEC ID nº 32), ANISHKDMQLGN (SEC ID nº 33), ANISHKDMQLGL (SEC ID nº 34), ANISTKDMQLGA (SEC ID nº 70), ANISTKDMQLGQ (SEC ID nº 71), ANISTKDMQLGS (SEC ID nº 72), ANISTKDMQLGM (SEC ID nº 73), ANISMKDMQLGN (SEC ID nº 74), ANISTKDKQLGM (SEC ID nº 75), ANISTKDMQLGH (SEC ID nº 76), ANISAKDMQLGA (SEC ID nº 77), ANISMKDMQLGA (SEC ID nº 78), ANISTKDKQLGA (SEC ID nº 79), ANISTKDAQLGA (SEC ID nº 80), ANISMKDMQLGS (SEC ID nº 81), ANISTKDVQLGA (SEC ID nº 82), ANISTKDMQLGN (SEC ID nº 83), ANISTKDMQLGK (SEC ID nº 84), ANISMKDMQLGM (SEC ID nº 85), ANISTKDMQLGT (SEC ID nº 86), ANISHKDKQLGK (SEC ID nº 87), ANISMKDMQLGH (SEC ID nº 88), y ANISAKDAQLGA (SEC ID nº 89).

Según una forma de realización particularmente preferente, por lo menos un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 99 comprende en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la misma por lo menos un residuo cisteína unido directamente o mediante una secuencia espaciadora a la misma.

Dicho residuo de cisteína puede actuar como grupo reactivo para unir el péptido a otra molécula o a un portador. Por ejemplo, dicho grupo puede utilizarse para unir el péptido a una proteína portadora. El residuo de cisteína

puede unirse directamente a los péptidos de la presente invención o mediante una secuencia espaciadora. La secuencia espaciadora comprende preferentemente por lo menos uno, preferentemente por lo menos dos, más preferentemente por lo menos tres, todavía más preferentemente por lo menos cuatro, y opcionalmente un máximo de diez, preferentemente un mínimo de cinco residuos aminoácidos no polares pequeños, tales como glicina.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el portador se selecciona de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa americana (KLH), CRM197, toxoide tetánico (TT), toxina diftérica (DT), proteína D o cualquier otra proteína o péptido que contiene epítomos de célula T.

Según la presente invención, el péptido se acopla o se fusiona con un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa americana), toxoide tetánico, proteína de unión a albúmina, albúmina de suero bovino, un dendrímero, conectores peptídicos (o regiones flanqueantes), así como las sustancias adyuvantes indicadas en Singh *et al.* (Singh *et al.*, Nat. Biotech. 17:1075-1081, 1999 (en particular los indicados en la Tabla 1 de dicho documento)), y O'Hagan *et al.* (O'Hagan y Valiante, Nature Reviews, Drug Discovery 2(9):727-735, 2003 (en particular, los compuestos inmunopotenciadores endógenos y sistemas de administración indicados en dicha referencia)) o mezclas de los mismos. Las reacciones de conjugación (por ejemplo mediante compuestos heterobifuncionales, tales como GMBS y, evidentemente, también otros, tales como los indicados en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson) en el presente contexto pueden seleccionarse de entre las reacciones conocidas por el experto en la materia.

Alternativamente, también resulta posible fusionar el péptido o péptidos de la presente invención a una proteína portadora mediante procedimientos conocidos de la técnica. Dichas proteínas comprenden un péptido tal como se indica en la presente memoria junto con una proteína inmunogénica no relacionada. Preferentemente, la proteína inmunogénica es capaz de inducir una respuesta de memoria. Entre los ejemplos de dichas proteínas se incluyen proteínas del tétanos, de la tuberculosis, de la hepatitis y la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria Gram-negativa *Haemophilus influenza B* (documento WO 91/18926). Preferentemente, se utiliza un derivado de la proteína D que comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100 a 110 aminoácidos N-terminales) y que pueden encontrarse lipomodificados. Otro portador que puede utilizarse para proporcionar proteínas de fusión puede ser la proteína conocida como LYTA o una parte de la misma (preferentemente una parte C-terminal). LYTA se deriva de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; Gene 43:265-292, 1986). LYTA es una autolisina que degrada específicamente determinados enlaces en el esqueleto peptidoglicano. En una forma de realización preferente, puede incorporarse una porción repetida de LYTA en una proteína de fusión. Se encuentra una porción repetida en la región C-terminal que se indica en el residuo 178. Una parte repetida particularmente preferente incorpora los residuos 188 a 305.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido se formula con un adyuvante, preferentemente adsorbido en alúmina.

La vacuna según la presente invención 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 MF59, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12 y GM-CSF), saponinas (por ejemplo, QS21), derivados de MDP, oligos CpG, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (por ejemplo, de Freund y APS), liposomas, virosomas, iscomas, cocleatos, micropartículas de PLG, partículas de poloxámero, partículas de tipo vírico, enterotoxina termolábil (LT), toxina de cólera (CT), toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 y LTR72), micropartículas y/o liposomas polimerizados.

Los adyuvantes adecuados se encuentran disponibles comercialmente tales como, por ejemplo, AS01B, AS02A, AS15, AS-2 y derivados de los mismos (GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA), CWS, TDM, Leif, sales de aluminio, tales como gel de hidróxido de aluminio (alúmina) o fosfato de aluminio, sales de calcio, hierro o cinc, una suspensión insoluble de tirosina acilada, azúcares aciladas, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizadas, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil-lípido A y Quil-A. Las citocinas, tales como GM-CSF o interleuquina-2, -7 o -12, también pueden utilizarse como adyuvantes.

En las vacunas proporcionadas en la presente memoria, la composición adyuvante está diseñada preferentemente para inducir una respuesta inmunológica predominantemente del tipo Th1. Los niveles elevados de citocinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunológicas mediadas por células a un antígeno administrado. En contraste, los niveles elevados de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunológicas humorales.

Tras la aplicación de una vacuna tal como se proporciona en la presente memoria, un paciente soportará una respuesta inmunológica que incluye las respuestas de tipo Th1 y Th2. En una forma de realización preferente, en la que la respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 incrementará en un mayor grado el nivel de las citocinas de tipo Th2. Los niveles de dichas citocinas pueden evaluarse fácilmente

utilizando ensayos estándares. Para una revisión de las familias de citocinas, véase Janeway *et al.*, Immunobiology, 5ª edición, 2001.

Entre los adyuvantes preferentes para la utilización en la inducción de una respuesta predominantemente de tipo Th1 se incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil-lípido A, preferentemente monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL), opcionalmente con una sal de aluminio (véase, por ejemplo, Ribi *et al.*, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, 1986:407-419; documentos GB 2 122 204 B, GB 2 220 211 y patente US nº 4.912.094). Una forma preferente de 3D-MPL es una emulsión que presenta un tamaño de partícula pequeño, de diámetro inferior a 0,2 µm, y el procedimiento de preparación de la misma se dan a conocer en el documento WO 94/21292. Se han descrito formulaciones acuosas que comprenden monofosforil-lípido A y un surfactante en el documento WO 98/43670. Entre los adyuvantes preferentes ejemplificados se incluyen AS01B (MPL y QS21 en una formulación de liposomas), 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposomas, AS02A (MPL y QS21 y una emulsión de aceite en agua), 3D-MPL y QS21 y una emulsión de aceite en agua, y AS 15, disponible de GlaxoSmithKline. Los adyuvantes de MPL se encuentran disponibles de GlaxoSmithKline, Seattle, USA (véanse las patentes US nº 4.436.727, US nº 4.877.611, US nº 4.866.034 y US nº 4.912.094).

Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no se encuentra metilado) también inducen una respuesta predominantemente de Th1. CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótido citosina-guanosina presentes en el ADN. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen en, por ejemplo, los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y patentes US nº 6.008.200 y US nº 5.856.462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimuladoras en, por ejemplo, Sato *et al.*, Science 273:352, 1996. En el caso de que CpG se formule en vacunas generalmente se administran en solución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente con un antígeno (documento WO 98/16247) o se formulan con un portador, tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de la hepatitis) (Davis *et al.*, *supra*; Brazolot-Millan *et al.*, PNAS USA 95(26):15553-8, 1998). CpG es conocido de la técnica como adyuvante que puede administrarse por vías tanto sistémica como mucosal (documento WO 96/02555, patente EP 0 468 520; Davis *et al.*, J. Immunol. 160(2):870-876, 1998; McCluskie y Davis, J. Immunol. 161(9):4463-6, 1998).

Otro adyuvante preferente es una saponina o miméticos o derivados de la saponina, preferentemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc.), que pueden utilizarse solos o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil-lípido A y derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL tal como se indica en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactiva en la que QS21 se desactiva con colesterol tal como se indica en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones preferentes comprenden una emulsión de aceite-en-agua y tocoferol. Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 94/17210. Entre los adyuvantes de saponina adicionales de utilización en la presente invención se incluyen QS7 (descritos en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711) y QS17 (descritos en las patentes US nº 5.057.540 y EP 0 362 279 B1).

Entre otros adyuvantes preferentes se incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), APS (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (por ejemplo, SBAS-2, AS2', AS2, SBAS-4 o SBAS6, disponibles de GlaxoSmithKline), Detox (Corixa), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP). Entre los adyuvantes ejemplares adicionales se incluyen MPL sintético y adyuvantes basados en la subunidad B de la toxina Shiga (véase el documento WO 2005/112991).

La vacuna de la presente invención puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa (véase, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc., 2004). Dependiendo de la vía de administración, el medicamento puede comprender los portadores, adyuvantes y/o excipientes correspondientes.

La vacuna según la presente invención contiene el compuesto según la invención 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 100 µg, o alternativamente, de por ejemplo 100 fmoles a 10 µmoles, preferentemente de entre 10 pmoles y 1 µmol, en particular de entre 100 pmoles y 100 nmoles. El compuesto o péptido de la presente invención se administra en un mamífero en una cantidad de entre preferentemente 100 ng y 1 mg, más preferentemente de entre 1 µg y 500 µg, todavía más preferentemente de entre 10 µg y 100 µg, en particular de entre 20 y 40 o 30 µg, por cada dosis. Típicamente, la vacuna puede contener además sustancias auxiliares, por ejemplo, tampones, estabilizadores, etc. La vacuna según la presente invención se aplica 3 a 6 veces en un intervalo de tiempo de entre dos semanas y hasta 2 meses. Los anticuerpos anti-C5a existentes se aplican en la vacuna a intervalos regulares de aproximadamente 6 meses.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la vacuna se utiliza en el tratamiento de un trastorno mediado por el complemento (véase, por ejemplo, Allegretti M. *et al.*, Curr. Med. Chem. 12:217-236, 2005). De esta manera, la presente invención se refiere además a un procedimiento de tratamiento de un

individuo que sufre de un trastorno mediado por el complemento mediante la administración de una vacuna según la presente invención.

5 El trastorno mediado por el complemento se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en una enfermedad inflamatoria, preferentemente una enfermedad inflamatoria crónica, degeneración macular asociada a la edad (AMD), un trastorno neurodegenerativo, especialmente la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington, asma alérgica, aterosclerosis, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis, dermatitis inflamatoria, especialmente soriasis y urticaria, artritis reumatoide, síndrome antifosfolípido (APS), esclerosis múltiple, síndrome urémico hemolítico y lupus eritematoso sistémico (SLE); lesión por isquemia-reperusión, lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS), sepsis, cáncer, complicaciones del embarazo, tales como preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes, retardo del crecimiento intrauterino y trombosis asociada a la hemodiálisis.

15 Un trastorno mediado por el complemento, según la presente invención, también es un trastorno que implica una actividad del complemento no deseable o inapropiada, tal como trombosis asociada a la hemodiálisis. Esta actividad puede determinarse mediante procedimientos conocidos de la técnica. Los trastornos que pueden tratarse con la vacuna según la presente invención se caracterizan por una actividad de C5a incrementada.

20 La AMD es una condición médica que habitualmente afecta a adultos de mayor edad y resulta en una pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula) debido al daño a la retina. Se produce en las formas "seca" y "húmeda", mientras que la forma seca constituye 90% de todos los casos de AMD. Una de las características clínicas distintivas más tempranas de la AMD húmeda y seca es la aparición de depósitos lipoproteicos amorfos que se acumulan extracelularmente en zonas próximas al epitelio pigmentario retiniano. Estos componentes patogénicos se denominan drusas. Algunos estudios recientes implican la inflamación local y la activación de la cascada del complemento en la formación de las drusas, la característica diagnóstica de AMD seca. Lo anterior concuerda con otros estudios que demuestran que, aparte de otras moléculas, el componente C5 del complemento, se acumula dentro de dichas drusas.

30 Además, se ha demostrado que C5a, aparte de VEGF (C5a participa en la liberación de VEGF), desempeña una función crucial en la inducción de la neovascularización coroidal, que tiene lugar en la forma húmeda de AMD. Más importante, se ha podido demostrar que los anticuerpos neutralizadores de C5a son capaces de detener la progresión de la enfermedad en modelos animales.

35 Conjuntamente estos datos apoyan fuertemente que la mediación del complemento en las formas húmeda y seca de AMD y, de esta manera, C5a aparentemente es una diana óptima para el tratamiento de ambas formas de AMD.

40 La inflamación mediada por el complemento, causada predominantemente por C5a, se propone que desempeña un papel en la aceleración o progresión de la enfermedad de Alzheimer. La activación prolongada del complemento resulta inducida por placas de A β fibrilares en el cerebro con enfermedad de Alzheimer y muchas manifestaciones de la enfermedad podrían atribuirse a células gliales con reclutamiento de C5a y activadas que inducen sucesos inflamatorios. Podrían aplicarse sucesos similares a la enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. Además, los datos preliminares indican un papel patogénico específico del fragmento de activación del complemento C5 (C5a) en la enfermedad de las neuronas motoras, un grupo de trastornos degenerativos que provocan la muerte progresiva de las neuronas motoras que conduce finalmente a la parálisis y la muerte.

50 El bloqueo de C5aR reduce claramente la inflamación de las vías respiratorias y la hipersensibilidad de las mismas en el asma alérgico experimental. Sin embargo, el papel del componente del complemento C5 en el asma sigue siendo controvertido. Se ha descrito C5 como estimulador o protector de la hipersensibilidad de las vías respiratorias en el asma alérgica experimental, sugiriendo una función doble de C5a en el asma alérgico. Una hipótesis es que la señalización de C5aR durante la sensibilización a alérgenos protege frente al desarrollo de la alergia pulmonar pero potencia el fenotipo alérgico en un medio pulmonar inflamado durante la etapa efectora. De esta manera, el bloqueo de C5aR podría presentar beneficio terapéutico en el tratamiento de asma establecido.

55 C5a desempeña también un papel en la aterosclerosis. C3a y C5a se expresan en las placas coronarias humanas. Además, se ha demostrado recientemente que C5a predice sucesos cardiovasculares en pacientes con aterosclerosis avanzada y que los niveles séricos elevados de C5a están asociados al desarrollo de restenosis tras la angioplastia con balón de la arteria femoral superficial.

60 La vasculitis es un proceso inflamatorio de los vasos sanguíneos, caracterizado histopatológicamente por inflamación y necrosis fibrinoide de la pared vascular. El espectro clínico de dicha forma de vasculitis es variable, yendo desde la púrpura a una glomerulonefritis proliferativa severa y se cree que los sistemas del complemento presentan una participación crucial en estos procesos. Por ejemplo, C5a desempeña un papel importante en la vasculitis asociada a autoanticuerpos (ANCA) citoplasmática anti-neutrófilos, una enfermedad autoinmunitaria

sistémica relativamente poco común pero potencialmente letal. La glomerulonefritis crescéntica necrotizante inducida por ANCA requiere la participación del complemento en su patogénesis. C5a y el C5aR de neutrófilos pueden componer un bucle de amplificación para la activación de neutrófilos mediada por ANCA. El C5aR podría proporcionar una nueva diana terapéutica para la glomerulonefritis crescéntica necrotizante inducida por ANCA.

5

La activación del complemento participa en la patogénesis de los cambios inflamatorios en la dermatitis autoinmunitaria, incluyendo el pénfigoide buloso (BP), la soriasis vulgar y la urticaria crónica. En la activación del complemento en el pénfigo por el anticuerpo del pénfigo en la epidermis aparentemente es responsable del desarrollo de cambios inflamatorios característicos denominados espongiosis eosinofílica. En las escamas soriáticas se observan niveles elevados de C5a, indicando que la activación del complemento está implicada en dicha enfermedad. Es conocido que la soriasis es una enfermedad mediada por células T; sin embargo, los neutrófilos y los mastocitos también podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Las células T y los neutrófilos resultan quimioatraídos por C5a; por lo tanto, C5a podría ser una importante diana terapéutica para el tratamiento de la soriasis.

10

15

La activación del complemento también contribuye a la enfermedad inflamatoria autoinmunitaria, artritis reumatoide. Aparentemente la anafilatoxina C5a es el producto principal de la activación del complemento responsable de los daños tisulares en la artritis reumatoide, aunque la deposición del complejo de ataque membranario, así como la opsonización con fragmentos de C3b, también resulta importante.

20

La función del complemento en la patogénesis del lupus sistémico eritematoso (SLE) sigue siendo controvertida. Por una parte, los componentes del complemento aparentemente median en el daño tisular iniciado por autoanticuerpos. Por otra parte, el sistema del complemento aparentemente presenta características protectoras ya que las deficiencias hereditarias de algunos complementos están asociadas a un riesgo incrementado de SLE. Es conocido que los pacientes con SLE con frecuencia presentan hipocomplementemia. Además, se ha demostrado que la señalización de C5a/C5aR desempeña una función importante en la patogénesis del lupus del sistema nervioso central mediante la regulación de la integridad de la barrera hematocefálica. El potencial del bloqueo de C5a/C5aR ha sido destacado como una estrategia terapéutica prometedora en el SLE.

25

30

Aparentemente la reperusión en los tejidos (R) y no la isquemia (I) activa el complemento y conduce a daños inducidos por la inflamación. Aunque todavía no se entiende bien cuál es la participación exacta de la activación del complemento en el daño por I/R, varios estudios experimentales señalan a una conexión entre el complemento y la patogénesis del daño por I/R y han propuesto la inhibición del complemento como una terapia potente. Por ejemplo, en un modelo murino de daño miocárdico por I/R, una inhibición sistémica de C5 treinta minutos antes de la reperusión protegió significativamente a ratones frente al daño miocárdico por I/R.

35

Se ha demostrado que se produce la activación del complemento en muchas formas de daño pulmonar agudo. La concentración de C5a se incrementa en los líquidos de lavado broncoalveolar (BALF) en el daño pulmonar agudo inducido por la instilación de ácido y la concentración de C5a también se encuentra elevada en pulmones trasplantados en seres humanos. C5a atrae los neutrófilos al interior del pulmón y activa directamente los neutrófilos, macrófagos y células endoteliales. La función protectora de anti-C5a se ha asociado a una reducción drástica de los niveles en los BALF de TNF- α , así como a una profunda reducción de la expresión de la molécula de adhesión intercelular vascular de pulmón ICAM-1, sugiriendo que C5a resulta esencial en la constitución de la red inflamatoria, regulando la expresión de los mediadores inflamatorios y la expresión de moléculas de adhesión.

40

45

La lesión pulmonar aguda y el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS) se caracterizan por la presencia de exudados inflamatorios ricos en fibrina en los espacios intraalveolares y la migración extensiva de neutrófilos hacia el interior de los alveolos de los pulmones. El bloqueo farmacológico de la señalización de TNF- α y C5a en los neutrófilos de voluntarios sanos pudo reducir significativamente la actividad procoagulante inducida por BALF de estas células de otro modo normales y provocar una pérdida concomitante de la expresión del factor tisular (TF). Estos resultados indican que la señalización de C5a y TNF- α contribuye a la inducción de la expresión del TF en neutrófilos que se acumulan en los alvéolos de los pulmones afectados por el ARDS.

50

55

Durante el inicio de la sepsis, el sistema inflamatorio se torna hiperactivo, implicando mecanismos de defensa tanto celulares como humorales. Se ha demostrado que la activación del complemento durante la sepsis humana, especialmente tal como reflejan los niveles elevados de C5a, se asocia a tasas de supervivencia significativamente reducidas junto con el fallo multiorgánico en comparación con pacientes y supervivientes sépticos menos severos. Además, la intercepción de C5a o C5aR mejora drásticamente la supervivencia durante la sepsis experimental en roedores. De esta manera, C5a aparentemente es un jugador clave en el desarrollo de la sepsis y la interferencia en la unión de C5a/C5aR puede presentar un potente enfoque clínico para el tratamiento preventivo de pacientes en riesgo elevado de desarrollo de la sepsis.

60

En la derivación cardiopulmonar y la hemodiálisis, C5a se genera como resultado de la activación de la ruta alternativa del complemento al entrar en contacto la sangre humana con la superficie artificial de la máquina cardiopulmonar o de la máquina de diálisis renal. C5a provoca una permeabilidad capilar incrementada y edema,

65

la broncoconstricción, la vasoconstricción pulmonar, la activación leucocitaria y plaquetaria y la infiltración en los tejidos, en particular en el pulmón. Se demostró que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-C5a reducía la disfunción endotelial coronaria inducida por la derivación cardiopulmonar y la cardioplejía.

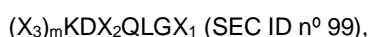
5 La activación del complemento controlada por los tumores puede proporcionar una ventaja al crecimiento tumoral. La generación del complemento C5a en el microambiente tumoral incrementa el crecimiento tumoral mediante la supresión de la respuesta antitumoral mediada por células T CD8⁺. La utilización de un modelo de ratón del crecimiento tumoral reveló que la deficiencia o el bloqueo de C5aR se asocia al retardo del crecimiento tumoral. Por lo tanto, la inhibición del complemento se considera un enfoque eficaz y prometedor en la terapia anticancerosa.

10 Un incremento significativo de la activación del complemento se asocia a diferentes resultados de embarazo patológico, es decir la preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes, el retardo del crecimiento intrauterino y el síndrome antifosfolípido (APS). Las mujeres con preeclampsia mostraban una concentración plasmática incrementada de C5a en comparación con las mujeres embarazadas normales. En referencia a APS, los anticuerpos antifosfolípido y la activación del complemento (mediante C3a, C5a y MAC) podrían colaborar en la inducción de un proceso inflamatorio local, conduciendo finalmente a la trombosis placentaria, la hipoxia y la infiltración de los neutrófilos. El factor tisular (FT) representa la unión entre C5a y la activación de los neutrófilos en la lesión fetal inducida por anticuerpos antifosfolípido.

15 En resumen, la respuesta inmunológica inducida por péptido contra C5a resulta en una terapia eficaz para las enfermedades (inflamatorias crónicas) mediadas por C5a, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Fonseca M.I. *et al.*, *J. Immunol.* "Treatment with a C5aR Antagonist Decreases Pathology and Enhances Behavioral Performance in Murine Models of Alzheimer's Disease", 2009, y Klos A. *et al.*, *Mol. Immunol.* "The role of the anaphylatoxins in health and disease", 2009), la enfermedad de Parkinson (véase, por ejemplo, McGeer P.L. *et al.*, *Parkinsonism Relat. Disord.* "Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease", 2004), la enfermedad de Huntington (véase, por ejemplo, Singhrao S.K. *et al.*, *Exp. Neurol.*, "Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease", 1999) y degeneración macular asociada a la edad (véase, por ejemplo, Nozaki M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, "Drusen complement components C3a y C5a promote choroidal neovascularization", 2006), la artritis reumatoide (véase, por ejemplo, Okroj M. *et al.*, *Ann. Med.*, "Rheumatoid arthritis and the complement system", 2007), lupus sistémico eritematoso (SLE) (véase, por ejemplo, Chen M. *et al.*, *J. Autoimmun.*, "The complement system in systemic autoimmune disease", 2009; Jacob A. *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, "Inhibition of C5a receptor alleviates experimental CNS lupus", 2010, y Jacob A. *et al.*, *FASEB J.*, "C5a alters blood-brain barrier integrity in experimental lupus", 2010), el asma (véase, por ejemplo, Kohl J. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, "A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma", 2006), la vasculitis, el síndrome antifosfolípido (APS), la aterosclerosis, la dermatitis inflamatoria, tal como la soriasis y la urticaria crónica, el síndrome de Guillain-Barre, el síndrome urémico hemolítico y la esclerosis múltiple. Debido a que la liberación de hC5a no controlada contribuye a otras condiciones patológicas, tales como la isquemia y el daño por reperfusión, la sepsis, la lesión pulmonar aguda, las complicaciones asociadas a la hemodiálisis, el cáncer, complicaciones del embarazo, tales como la preeclampsia y la APS, la neutralización de C5a mediante la inmunización activa puede proporcionar también una terapia eficaz para dichas complicaciones patológicas.

20 El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a proporcionar un tratamiento, es decir, proporcionar cualquier tipo de control médico o quirúrgico de un sujeto. El tratamiento puede proporcionarse para revertir, aliviar o inhibir la progresión; para prevenir o reducir la probabilidad de una enfermedad, trastorno o condición, o para revertir, aliviar, inhibir o prevenir la progresión, prevenir o reducir la probabilidad de uno o más síntomas o manifestaciones de una enfermedad, trastorno o condición. El término "prevenir" se refiere a causar que una enfermedad, trastorno, condición, o síntoma o manifestación de lo anterior no se produzca durante como mínimo un periodo de tiempo en por lo menos algunos individuos. El tratamiento puede incluir la administración de un agente en el sujeto tras el desarrollo de uno o más síntomas o manifestaciones indicativas de una condición mediada por el complemento, por ejemplo con el fin de revertir, aliviar, reducir la severidad, y/o de inhibir o evitar la progresión de la condición y/o de revertir, aliviar, reducir la severidad y/o inhibir uno o más síntomas o manifestaciones de la condición. Una composición de la presente invención puede administrarse en un sujeto que ha desarrollado un trastorno mediado por el complemento o presenta un riesgo incrementado de desarrollar dicho trastorno respecto a un miembro de la población general. Una composición de la presente invención puede administrarse profilácticamente, es decir, antes del desarrollo de cualquier síntoma o manifestación de la condición. Típicamente en este caso el sujeto presenta un riesgo de desarrollar la condición.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido que consiste en 7 a 19 residuos aminoácidos que consta de la secuencia de aminoácidos:



30 en la que:

X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, treonina, tirosina y valina,

5 X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, tirosina y valina,

10 X_3 es $(X_4)_n$ ANISX₅ (SEC ID nº 100) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consiste en 1 a 4 residuos aminoácidos,

10 X_4 es VVASQLR (SEC ID nº 101) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consiste en 1 a 6 residuos aminoácidos,

15 X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, histidina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina,

m es 0 o 1, y

20 n es 0 o 1,

en la que dicho péptido o péptidos se acoplan o se fusionan a un portador que comprende por lo menos un epítipo de células T.

25 Según una forma de realización de la presente invención, X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en treonina, glutamina, tirosina, metionina, alanina, glicina y valina.

30 X_1 es preferentemente un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina, en caso de que m sea 1 y X_5 sea un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, histidina, metionina y treonina, preferentemente alanina, treonina o metionina, y/o X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en metionina, alanina, lisina y valina.

35 Según una forma de realización particularmente preferente de la presente invención, m es 1 y X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, histidina, metionina y treonina, preferentemente alanina, treonina o metionina.

Según otra forma de realización preferida de la presente invención, X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en metionina, alanina, lisina y valina.

40 Según una forma de realización particularmente preferente de la presente invención, el péptido se selecciona de entre el grupo que consiste en ISHKDMQLGA (SEC ID nº 14), ANISHKDMQLGA (SEC ID nº 21), KDMQLGA (SEC ID nº 22), VVASQLRANISHKDMQLGA (SEC ID nº 23), ANISHKDMQLGT (SEC ID nº 24), ANISHKDMQLGQ (SEC ID nº 25), ANISHKDMQLGY (SEC ID nº 26), ANISHKDMQLGM (SEC ID nº 27), ANISHKDMQLGG (SEC ID nº 28), ANISHKDMQLGV (SEC ID nº 29), ANISHKDMQLGK (SEC ID nº 30), ANISHKDMQLGS (SEC ID nº 31), ANISHKDMQLGH (SEC ID nº 32), ANISHKDMQLGN (SEC ID nº 33), ANISHKDMQLGL (SEC ID nº 34), ANISTKDMQLGA (SEC ID nº 70), ANISTKDMQLGQ (SEC ID nº 71), ANISTKDMQLGS (SEC ID nº 72), ANISTKDMQLGM (SEC ID nº 73), ANISMKDMQLGN (SEC ID nº 74), ANISTKDKQLGM (SEC ID nº 75), ANISTKDMQLGH (SEC ID nº 76), ANISAKDMQLGA (SEC ID nº 77), ANISMKDMQLGA (SEC ID nº 78), ANISTKDKQLGA (SEC ID nº 79), ANISTKDAQLGA (SEC ID nº 80), ANISMKDMQLGS (SEC ID nº 81), ANISTKDVQLGA (SEC ID nº 82), ANISTKDMQLGN (SEC ID nº 83), ANISTKDMQLGK (SEC ID nº 84), ANISMKDMQLGM (SEC ID nº 85), ANISTKDMQLGT (SEC ID nº 86), ANISHKDKQLGK (SEC ID nº 87), ANISMKDMQLGH (SEC ID nº 88) y ANISAKDAQLGA (SEC ID nº 89).

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en 7 a 19 residuos aminoácidos que consta de la secuencia de aminoácidos:

$(X_3)_m$ KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 99),

60 en la que:

X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, alanina, asparagina, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, treonina, tirosina y valina, más preferentemente arginina,

65 X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, treonina, tirosina y valina, preferentemente alanina, valina, treonina, tirosina o

leucina, más preferentemente valina,

X_3 es $(X_4)_n$ ANISX₅ (SEC ID nº 100) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consiste en 1 a 4 residuos aminoácidos,

5

X_4 es VVASQLR (SEC ID nº 101) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consiste en 1 a 6 residuos aminoácidos,

X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, histidina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina, más preferentemente histidina,

10

m es 0 o 1, y

15

n es 0 o 1,

en la que dicho péptido o péptidos se acoplan o se fusionan con un portador que comprende por lo menos un epítipo de células T.

20

Sin embargo, otro aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en 7 a 19 residuos aminoácidos que consta de la secuencia de aminoácidos:

$(X_3)_m$ KDX₂QLGX₁ (SEC ID nº 99),

25

en la que:

X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, alanina, asparagina, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, treonina, tirosina y valina, más preferentemente arginina,

30

X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, tirosina y valina, preferentemente metionina,

X_3 es $(X_4)_n$ ANISX₅ (SEC ID nº 100) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consiste en 1 a 4 residuos aminoácidos,

35

X_4 es VVASQLR (SEC ID nº 101) o un fragmento truncado N-terminal del mismo que consiste en 1 a 6 residuos aminoácidos,

X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, arginina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina, preferentemente treonina, glutamina, ácido glutámico, serina, lisina o asparagina, más preferentemente treonina o glutamina,

40

m es 0 o 1, y

45

n es 0 o 1,

en la que dicho péptido o péptidos se acoplan o se fusionan con un portador que comprende por lo menos un epítipo de células T.

50

Según una forma de realización preferida de la presente invención, X_3 es $(X_4)_n$ ANISX₅ (SEC ID nº 100) o un fragmento truncado N-terminal del mismo y X_1 es arginina. En consecuencia, dicho fragmento truncado N-terminal y X_1 es arginina. En consecuencia, dicho fragmento truncado N-terminal puede consistir en ANISX₅ (SEC ID nº 102), NISX₅ (SEC ID nº 103), ISX₅, SX₅ o X₅. Lo anterior implica que la vacuna de la presente invención puede comprender por lo menos un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos ANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 119), NISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 120), ISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 121), SX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 122) o X₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 12), en caso de que m=1.

55

Según una forma de realización preferida de la presente invención, X_4 es VVASQLR (SEC ID nº 101) o un fragmento truncado N-terminal del mismo. El fragmento de VVASQLR puede consistir en una de las secuencias de aminoácidos siguientes: VASQLR (SEC ID nº 109), ASQLR (SEC ID nº 110), SQLR (SEC ID nº 111), QLR, LR o R. En consecuencia, el péptido o péptidos utilizados en la vacuna de la presente invención pueden presentar una de las secuencias de aminoácidos siguientes: VVASQLRANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 124), VASQLRANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 125), ASQLRANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 126), SQLRANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 127), QLRANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 128), L RANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 129) o RANISX₅KDX₂QLGR (SEC ID nº 130), en caso de que m y n sean 1.

60

65

En una forma de realización particularmente preferente de la presente invención, X_5 de SEC ID nº 119 a nº 130 es histidina en caso de que X_2 es un residuo aminoácido tal como se ha definido anteriormente y no metionina.

- 5 En una forma de realización preferida adicional de la presente invención, X_2 es SEC ID nº 119 a nº 130 es metionina en el caso de que X_5 sea un residuo aminoácido tal como se ha definido anteriormente y no histidina.

Según una forma de realización particularmente preferente de la presente invención, el péptido se selecciona de entre el grupo que consiste en ANISHKDVQLGR (SEC ID nº 56), ANISHKDTQLGR (SEC ID nº 57), ANISHKDYQLGR (SEC ID nº 58), ANISHKDLQLGR (SEC ID nº 59), ANISHKDAQLGR (SEC ID nº 18), ANISTKDMQLGR (SEC ID nº 39), ANISQKDMQLGR (SEC ID nº 40), ANISEKDMQLGR (SEC ID nº 41), ANISSKDMQLGR (SEC ID nº 42), ANISKKDMQLGR (SEC ID nº 43) y ANISNKDMQLGR (SEC ID nº 44), preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en ANISHKDVQLGR (SEC ID nº 56), ANISTKDMQLGR (SEC ID nº 39) y ANISQKDMQLGR (SEC ID nº 40).

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste en ANISHKDVQLGR (SEC ID nº 56), ANISHKDTQLGR (SEC ID nº 57), ANISHKDYQLGR (SEC ID nº 58), ANISHKDLQLGR (SEC ID nº 59), ANISHKDAQLGR (SEC ID nº 18), ANISTKDMQLGR (SEC ID nº 39), ANISQKDMQLGR (SEC ID nº 40), ANISEKDMQLGR (SEC ID nº 41), ANISSKDMQLGR (SEC ID nº 42), ANISKKDMQLGR (SEC ID nº 43) y ANISNKDMQLGR (SEC ID nº 44), preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en ANISHKDVQLGR (SEC ID nº 56), ANISTKDMQLGR (SEC ID nº 39) y ANISQKDMQLGR (SEC ID nº 40).

20 La presente invención es ilustrada adicionalmente mediante las figuras y ejemplos a continuación, aunque sin limitación a los mismos.

La figura 1 muestra un escaneo de alaninas (SEC ID nº 5 a nº 23) de los fragmentos C-terminales de diversa longitud de hC5a (SEC ID nº 1 a nº 4) con el fin de definir posiciones que pueden intercambiarse sin anular la inmunogenicidad y la capacidad de inducir anticuerpos contra hC5a. La figura 1(A) muestra la inmunogenicidad (ilustrada como títulos) de la posición 65-74 del epítipo hC5a original (SEC ID nº 1) y VARIOTOPOS del mismo, (B) de la posición 63-74 del epítipo hC5a original (SEC ID nº 2) y VARIOTOPOS del mismo, (C) de la posición 68-74 del epítipo hC5a original (SEC ID nº 3) y un VARIOTOPO del mismo, (D) de la posición 55-74 del epítipo hC5a original (SEC ID nº 4) y un VARIOTOPO del mismo.

35 La figura 2 muestra la actividad de inhibición de los sueros inmunológicos de ratones que habían sido vacunados con los VARIOTOPOS SEC ID nº 5 a nº 23 en relación a las secuencias del epítipo original, que se ilustra como 100% (SEC ID nº 1 a nº 4). La figura 2(A) muestra la inhibición de los sueros inmunológicos inducidos por el epítipo original hC5a posición 65-74 (SEC ID nº 1) y VARIOTOPOS del mismo, (B) del epítipo original hC5a posición 63-74 (SEC ID nº 2) y VARIOTOPOS del mismo, (C) del epítipo original hC5a posición 68-74 (SEC ID nº 3) y un VARIOTOPO del mismo, (D) del epítipo original hC5a posición 55-74 (SEC ID nº 4) y un VARIOTOPO del mismo.

40 La figura 3 muestra la evaluación de la actividad de inhibición de los anticuerpos inducidos por los VARIOTOPOS del fragmento C-terminal de 12 aminoácidos de longitud de hC5a (SEC ID nº 2), en el que R en la posición 74 de hC5a ha sido intercambiado por residuos aminoácidos de características diferentes (SEC ID nº 21, nº 24 a nº 38).

45 La figura 4 muestra la evaluación de la actividad de inhibición de los anticuerpos inducidos por VARIOTOPOS del fragmento C-terminal de 12 aminoácidos de longitud de hC5a (SEC ID nº 2), en el que H en la posición 67 de hC5a ha sido intercambio por residuos aminoácidos de características diferentes (SEC ID nº 17, nº 39 a nº 55).

50 La figura 5 muestra la evaluación de la actividad de inhibición de los anticuerpos inducidos por VARIOTOPOS del fragmento C-terminal de 12 aminoácidos de longitud de hC5a (SEC ID nº 2), en el que H en la posición 67 de hC5a ha sido intercambiado por residuos aminoácidos de características diferentes (SEC ID nº 18, nº 56 a nº 69).

55 La figura 6 muestra la actividad de inhibición de los anticuerpos inducida por VARIOTOPOS del fragmento C-terminal de 12 aminoácidos de longitud de hC5a (SEC ID nº 2), en el que R en la posición 74 de hC5a y uno o dos aminoácidos adicionales en la posición 67 o 70 han sido intercambiados por otros residuos aminoácidos (SEC ID nº 70 a nº 98).

Ejemplos

60 Un objetivo de la presente invención es desarrollar una respuesta inmunológica activa neutralizadora contra el exceso de C5a humano con el fin de evitar su actividad patológica en la enfermedad inflamatoria crónica o en

situaciones patológicas agudas.

Con el fin de conseguir dicho objetivo, se diseñaron los denominados VARIOTOPOS y se utilizaron para la inmunización con el fin de inducir anticuerpos contra el neopéptido C-terminal de la molécula de C5a humana. Este neopéptido en C5a se vuelve accesible al ser cortada la proteína C5 por la C5 convertasa, resultando en los fragmentos anafilácticos pequeños C5a y C5b, una parte del complejo de ataque membranario. Los VARIOTOPOS son péptidos inmunógenos que pueden inducir una respuesta inmunológica humoral contra una proteína de interés mediante la mimetización de un epítipo sobre la proteína diana. Por lo tanto, la ventaja de las vacunas de VARIOTOPOS es que eluden la autotolerancia frente a autoantígenos y reducen el riesgo de efectos secundarios no deseados que son prevalentes en la utilización de autoantígenos.

Todos los péptidos se ligaron químicamente mediante un residuo de cisteína en el extremo N-terminal a la proteína portadora hemocianina de lapa americana (KLH) y se administraron en ratones junto con alúmina como adyuvante. Todos los sueros inmunológicos que se obtuvieron a partir de los ratones inmunizados con VARIOTOPOS o con la secuencia C-terminal original de hC5a fueron analizados para su capacidad de inducir títulos de anticuerpos y anticuerpos activos funcionales contra hC5a.

Material y métodos:

Inmunización de ratones

Se utilizaron ratones BALB/c como sistema modelo para los experimentos de inmunización con hC5a-VARIOTOPO. Los ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de edad recibieron inmunizaciones de sensibilización-refuerzo cuatro veces a intervalos quincenales con vacunas de VARIOTOPO conjugado con KLH (200 µl por vía subcutánea en tampón de fosfato, pH=7,4). Como adyuvante se utilizó hidrogel de aluminio. Se utilizaron cinco a seis ratones para la inmunización con la vacuna de VARIOTOPO respectiva.

Ensayo de inmunogenicidad

Se analizaron los sueros inmunológicos de los ratones vacunados para su respuesta de anticuerpos frente a los péptidos inyectados (datos no mostrados) y frente a la proteína C5a humana utilizando el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Se determinaron los títulos de anticuerpo como la dilución de los sueros que proporcionaba una unión semimáxima (es decir, $DO_{max}/2$) y se presentan los títulos medios de todos los ratones en cada grupo.

Ensayo de inhibición de C5a

Se evaluó la actividad de inhibición del péptido o anticuerpos inducidos por VARIOTOPO contra hC5a utilizando el ensayo de liberación de enzima glucuronidasa utilizando células U937 humanas. Las células U937 se diferencian con adenosina 3':5'-monofosfato cíclico y tras la estimulación con proteína C5a recombinante humana, se libera β-glucuronidasa. Este efecto puede bloquearse mediante la adición de anticuerpos específicos de hC5a o sueros inmunológicos anti-C5a_h inducidos por péptido. en mayor detalle, se diferenciaron las células U937 durante 5 días con adenosina 3':5'-monofosfato cíclico (AMPC) 0,5 mM en RPMI, FCS al 10%. El día 5, las células fueron pretratadas con citocalasina B (2,5 µg/ml) durante 10 minutos a 37°C. Para cada enfoque, se estimularon $1,8 \times 10^5$ células pretratadas con hC5a 10 nM solo o con hC5a 10 nM más suero inactivado por calor al 8% (1 h a 56°C) derivado de ratones inmunizados con diferentes péptidos o VARIOTOPOS (SEC ID nº 1 a nº 98, tal como se indica en las Tablas 1 y 2) en un volumen final de 120 µl de tampón HAG-CM (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 125 mM, KCl 5 mM, glucosa 0,5 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA al 0,25%). Tras una incubación de 10 minutos a 37°C, se pelletizaron las células, se transfirió el sobrenadante a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyeron 1:1 con P-nitrofenil-β-D-glucurónido 0,01 M (disuelto en acetato sódico 0,1 M, pH=4,0) en un volumen total de 150 µl. La placa de microtitulación se incubó durante 1 h a 37°C en la oscuridad. A continuación, se detuvo la reacción mediante la adición de tampón de glicina 0,4 M (pH=10,0). La β-glucuronidasa convierte el P-nitrofenil-β-D-glucurónido a un color amarillento que se mide a 405 nm.

Tabla 1: epítipos C-terminales de C5a humano utilizados como molde para la generación de VARIOTOPOS.

Número de identificación de secuencia	Secuencia
SEC ID nº 1	ISHKDMQLGR
SEC ID nº 2	ANISHKDMQLGR
SEC ID nº 3	KDMQLGR
SEC ID nº 4	VVASQLRANISHKDMQLGR

ES 2 647 138 T3

Tabla 2: lista de VARIOTOPOS de fragmentos C-terminales de CD5a_h (SEC ID nº 1 a nº 4) en los que se han sustituido aminoácidos individuales o múltiples aminoácidos por residuos aminoácidos diferentes (subrayados e indicados en negrita).

Número de identificación de secuencia	Secuencia	Aminoácidos intercambiados de hC5a
SEC ID nº 5	<u>A</u> SHKDMQLGR	I65A
SEC ID nº 6	<u>I</u> AHKDMQLGR	S66A
SEC ID nº 7	<u>I</u> SAKDMQLGR	H67A
SEC ID nº 8	ISH <u>A</u> DMQLGR	K68A
SEC ID nº 9	ISHK <u>A</u> MQLGR	D69A
SEC ID nº 10	ISHK <u>D</u> AQLGR	M70A
SEC ID nº 11	ISHKDM <u>A</u> LGR	Q71A
SEC ID nº 12	ISHKDMQ <u>A</u> GR	L72A
SEC ID nº 13	ISHKDMQL <u>A</u> R	G73A
SEC ID nº 14	ISHKDMQLG <u>A</u>	R74A
SEC ID nº 15	<u>A</u> AISHKDMQLGR	N64A
SEC ID nº 16	AN <u>A</u> SHKDMQLGR	I65A
SEC ID nº 17	ANIS <u>A</u> KDMQLGR	H67A
SEC ID nº 18	ANISHK <u>D</u> AQLGR	M70A
SEC ID nº 19	ANISHKDMQ <u>A</u> GR	L72A
SEC ID nº 20	ANISHKDMQL <u>A</u> R	G73A
SEC ID nº 21	ANISHKDMQLG <u>A</u>	R74A
SEC ID nº 22	KDMQLG <u>A</u>	R74A
SEC ID nº 23	VVASQLRANISHKDMQLG <u>A</u>	R74A
SEC ID nº 24	ANISHKDMQLG <u>T</u>	R74T
SEC ID nº 25	ANISHKDMQLG <u>Q</u>	R74Q
SEC ID nº 26	ANISHKDMQLG <u>Y</u>	R74Y
SEC ID nº 27	ANISHKDMQLG <u>M</u>	R74M
SEC ID nº 28	ANISHKDMQLG <u>G</u>	R74G
SEC ID nº 29	ANISHKDMQLG <u>V</u>	R74V
SEC ID nº 30	ANISHKDMQLG <u>K</u>	R74K
SEC ID nº 31	ANISHKDMQLG <u>S</u>	R74S
SEC ID nº 32	ANISHKDMQLG <u>H</u>	R74H
SEC ID nº 33	ANISHKDMQLG <u>N</u>	R74N
SEC ID nº 34	ANISHKDMQLG <u>L</u>	R74L
SEC ID nº 35	ANISHKDMQLG <u>W</u>	R74W
SEC ID nº 36	ANISHKDMQLG <u>F</u>	R74F
SEC ID nº 37	ANISHKDMQLG <u>P</u>	R74P
SEC ID nº 38	ANISHKDMQLG <u>D</u>	R74D
SEC ID nº 39	ANIS <u>T</u> KDMQLGR	H67T
SEC ID nº 40	ANIS <u>Q</u> KDMQLGR	H67Q
SEC ID nº 41	ANIS <u>E</u> KDMQLGR	H67E
SEC ID nº 42	ANIS <u>S</u> KDMQLGR	H67S
SEC ID nº 43	ANIS <u>K</u> KDMQLGR	H67K
SEC ID nº 44	ANIS <u>N</u> KDMQLGR	H67N
SEC ID nº 45	ANIS <u>I</u> KDMQLGR	H67I
SEC ID nº 46	ANIS <u>R</u> KDMQLGR	H67R
SEC ID nº 47	ANIS <u>M</u> KDMQLGR	H67M
SEC ID nº 48	ANIS <u>V</u> KDMQLGR	H67V
SEC ID nº 49	ANIS <u>Y</u> KDMQLGR	H67Y
SEC ID nº 50	ANIS <u>L</u> KDMQLGR	H67L
SEC ID nº 51	ANIS <u>W</u> KDMQLGR	H67W
SEC ID nº 52	ANIS <u>G</u> KDMQLGR	H67G
SEC ID nº 53	ANIS <u>P</u> KDMQLGR	H67P
SEC ID nº 54	ANIS <u>F</u> KDMQLGR	H67F
SEC ID nº 55	ANIS <u>D</u> KDMQLGR	H67D
SEC ID nº 56	ANISHK <u>D</u> VQLGR	M70V
SEC ID nº 57	ANISHK <u>D</u> TQLGR	M70T
SEC ID nº 58	ANISHK <u>D</u> YQLGR	M70Y
SEC ID nº 59	ANISHK <u>D</u> LQLGR	M70L
SEC ID nº 60	ANISHK <u>D</u> KQLGR	M70K
SEC ID nº 61	ANISHK <u>D</u> HQLGR	M70H
SEC ID nº 62	ANISHK <u>D</u> RQLGR	M70R
SEC ID nº 63	ANISHK <u>D</u> WQLGR	M70W
SEC ID nº 64	ANISHK <u>D</u> SQLGR	M70S
SEC ID nº 65	ANISHK <u>D</u> FQLGR	M70F
SEC ID nº 66	ANISHK <u>D</u> NQLGR	M70N
SEC ID nº 67	ANISHK <u>D</u> PQLGR	M70P

Número de identificación de secuencia	Secuencia	Aminoácidos intercambiados de hC5a
SEC ID nº 68	ANISHKDGQLGR	M70G
SEC ID nº 69	ANISHKDDQLGR	M70D
SEC ID nº 70	ANISTKDMQLGA	H67T y R74A
SEC ID nº 71	ANISTKDMQLGQ	H67T y R74Q
SEC ID nº 72	ANISTKDMQLGS	H67T y R74S
SEC ID nº 73	ANISTKDMQLGM	H67T y R74M
SEC ID nº 74	ANISMKDMQLGN	H67M y R74N
SEC ID nº 75	ANISTKDKQLGM	H67T, M70K y R74M
SEC ID nº 76	ANISTKDMQLGH	H67T y R74H
SEC ID nº 77	ANISAKDMQLGA	H67A y R74A
SEC ID nº 78	ANISMKDMQLGA	H67M y R74A
SEC ID nº 79	ANISTKDKQLGA	H67T, M70K y R74A
SEC ID nº 80	ANISTKDAQLGA	H/T, M70A y R74A
SEC ID nº 81	ANISMKDMQLGS	H67M y R74S
SEC ID nº 82	ANISTKDVQLGA	H67T, M70V y R74A
SEC ID nº 83	ANISTKDMQLGN	H67T y R74N
SEC ID nº 84	ANISTKDMQLGK	H67T y R74K
SEC ID nº 85	ANISMKDMQLGM	H67M y R74M
SEC ID nº 86	ANISTKDMQLGT	H67T y R74T
SEC ID nº 87	ANISHKDKQLGK	M70K y R74K
SEC ID nº 88	ANISMKDMQLGH	H67M y R74H
SEC ID nº 89	ANISAKDAQLGA	H67A, M70A, y R74A
SEC ID nº 90	ANISMKDKQLGK	H67M, M70K, y R74K
SEC ID nº 91	ANISHKDSQLGK	M70S y R74K
SEC ID nº 92	ANISMKDMQLGF	H67M y R74F
SEC ID nº 93	ANISIKDMQLGA	H67I y R74A
SEC ID nº 94	ANISMKDMQLGK	H67M y R74K
SEC ID nº 95	ANISLKDMQLGA	H67L y R74A
SEC ID nº 96	ANISHKDKQLGF	M70K y R74F
SEC ID nº 97	ANISMKDKQLGF	H67M, M70K, y R74F
SEC ID nº 98	ANISIKDMQLGK	H67I y R74K

Tabla 3: abreviaturas de todos los aminoácidos y propiedades de las cadenas laterales de los mismos

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Propiedades de las cadenas laterales
Alanina	Ala	A	No polar, alifático
Arginina	Arg	R	Con carga positiva
Asparagina	Asn	N	Polar, sin carga
Ácido aspártico	Asp	D	Con carga negativa
Cisteína	Cys	C	Polar, sin carga
Ácido glutámico	Glu	E	Con carga negativa
Glutamina	Gln	Q	Polar, sin carga
Glicina	Gly	G	No polar, alifático
Histidina	His	H	Con carga positiva
Isoleucina	Ile	I	No polar, alifático
Leucina	Leu	L	No polar, alifático
Lisina	Lys	K	Con carga positiva
Metionina	Met	M	No polar, alifático
Fenilalanina	Phe	F	Aromático, No polar
Prolina	Pro	P	Polar, sin carga, disruptor estructural
Serina	Ser	S	Polar, sin carga
Treonina	Thr	T	Polar, sin carga
Triptófano	Trp	W	Aromático, No polar
Tirosina	Tyr	Y	Aromático, polar
Valina	Val	V	No polar, alifático

5 **Ejemplo 1: escaneo de alaninas de epítomos C-terminales de hC5a SEC ID nº 1 a nº 4 (Tabla 1) para definir posiciones que pueden intercambiarse de manera que la inmunogenicidad y la capacidad de inducir anticuerpos neutralizadores contra hC5a se mantenga o incluso se incremente.**

10 Los aminoácidos individuales del epítomo C-terminal hC5a se sustituyeron por un residuo de alanina y se sometieron a ensayo para su inmunogenicidad en comparación con la secuencia de epítomo original. Todos los VARIOTOPOS indujeron anticuerpos específicos que se unían al péptido inyectado; sin embargo, los títulos

contra la proteína hC5a difieren. El intercambio por alanina en la posición de hC5a 66 (S66A), K en la posición 68 (K68A), Q en la posición 71 (Q71A), L en la posición 72 (L72A) y G en la posición 73 (G73A) anuló claramente la inducción de anticuerpos que reconocían hC5a (figuras 1A y 1B, SEC ID nº 6, nº 8, nº 11, nº 12, nº 13, nº 19 y nº 20). Las secuencias originales SEC ID nº 1 a nº 3 indujeron títulos relativamente elevados, mientras que los títulos inducidos por los VARIOTOPOS SEC ID nº 6, nº 8, nº 11, nº 12, nº 13, nº 19 y nº 20 caen a menos de $13000 DO_{max}/2$, indicando que los aminoácidos S, K, Q, L y G (C5a_h posición 66, 68, 71, 72 y 73) resultan cruciales para la inducción de anticuerpos específicos de hC5a (figura 1A y 1B, Tabla 1-2).

En contraste, la sustitución por alanina de R en la posición 74 reveló un fuerte incremento de los anticuerpos reactivos anti-C5a_h. Lo anterior se manifestó no sólo para el fragmento C-terminal de 10 y 12 aminoácidos de longitud de hC5a (figuras 1A y 1B, SEC ID nº 14, nº 21) sino para todos los VARIOTOPOS C-terminales de hC5a de diferente longitud y el intercambio R74A sometido a ensayo (figuras 1C y 1D, SEC ID nº 22 y nº 23). Los títulos de los VARIOTOPOS R74A están comprendidos entre 56000 y 88000 y llegaron a un incremento de 5,5 veces respecto al título obtenido por la secuencia original (figura 1D, SEC ID nº 4 y nº 26). Los VARIOTOPOS con los intercambios N64A, I65A, H67A, D69A y M70A (SEC ID nº 5, nº 7, nº 9, nº 10 y nº 15 a nº 18) mostraron títulos relevantes contra hC5a en un grado similar a los epítomos originales SEC ID nº 1 y nº 2 (figuras 1A y 1B, Tablas 1 y 2). En resumen, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de los epítomos C-terminales de hC5a de diversa longitud llevó a resultados análogos, indicando que el impacto de residuos aminoácidos particulares sobre la inmunogenicidad contra hC5a sólo resultó influido de manera menor por la longitud de los péptidos. Especialmente la inmunización con fragmentos C-terminales de hC5a, en los que la R en la posición 74 había sido intercambiada por A, resultó en títulos significativamente incrementados contra hC5a en comparación con los epítomos originales. Los fragmentos de péptido que se utilizaron para la vacunación comprendían por lo menos los últimos 7 aminoácidos C-terminales de hC5a con el fin de garantizar la inmunogenicidad y podrían no exceder los 19 aminoácidos, la longitud definida del neopéptido C-terminal de hC5a.

La actividad de inhibición de los VARIOTOPOS en los que se sustituyeron los aminoácidos individuales por un residuo de alanina se evaluó mediante el ensayo de liberación con enzima glucuronidasa. Brevemente, las células U937 humanas diferenciadas liberaron β -glucuronidasa tras la estimulación con hC5a y este efecto puede bloquearse mediante la adición de sueros inmunológicos anti-C5a_h.

Los sueros inmunológicos inducidos por los VARIOTOPOS R74A mostraban la actividad de inhibición más elevada y en comparación con la secuencia original (SEC ID nº 1 a nº 4) se obtuvo un incremento de 2 veces de la actividad de inhibición (figura 2A-D, SEC ID nº 14, nº 21, nº 22 y nº 23). Además, los sueros inmunológicos inducidos por las SEC ID nº 5, nº 7, nº 10, nº 17 y nº 18 revelaron una actividad de inhibición que excedía o era comparable a la señal obtenida con los epítomos originales (figuras 2A y 2B). De esta manera, el intercambio H67A (SEC ID nº 7, nº 17), M70A (SEC ID nº 10 y nº 18) e I65A, en este caso sólo observada para el VARIOTOPO C-terminal de hC5a de 10 aminoácidos de longitud (SEC ID nº 5) y no para el de 12 aminoácidos (SEC ID nº 16), aparentemente resulta favorable para la inducción de anticuerpos activos funcionales contra hC5a; sin embargo, el intercambio R74A sigue siendo el mejor, a pesar de la diferente longitud de los VARIOTOPOS (figura 2A-D).

Los títulos de proteína obtenidos contra hC5a y los datos de actividad funcional basados en el ensayo de liberación de glucuronidasa mostraban una buena correlación. En los ejemplos posteriores sólo se muestra la actividad de inhibición de los sueros inmunológicos (anticuerpos) inducida por el epítomo original y por los VARIOTOPOS del mismo, que en principio es más predictiva de eficacia que los títulos de anticuerpos por sí solos.

Ejemplo 2:

El aminoácido clave identificado mediante el procedimiento de escaneo de alaninas era R en la posición 74 de hC5a, que resultó en un incremento de hasta dos veces de la inhibición de hC5a (véase la figura 2). De esta manera, en un siguiente experimento, se intercambió sistemáticamente dicha posición por una diversidad de aminoácidos que presentaban características similares u opuestas a las del residuo de arginina (véase la Tabla 3). Para este experimento se seleccionó como molde el epítomo C-terminal de 12 aminoácidos de longitud debido a que dicho fragmento (figura 1B) indujo títulos más altos contra hC5a que el fragmento de 10 aminoácidos de longitud o el de 20 aminoácidos de longitud (figuras 1A y D) y mostraba una mejor actividad de inhibición que el fragmento C-terminal de hC5a de 7 aminoácidos de longitud.

Se sometieron a ensayo 16 VARIOTOPOS R74X del epítomo C-terminal de 12 aminoácidos de longitud para su inmunogenicidad y su capacidad de inducir anticuerpos activos funcionales. Los sueros inmunológicos obtenidos a partir de los VARIOTOPOS con los intercambios R74T y R74Q mostraron la mejor inhibición en el ensayo de liberación de glucuronidasa (figura 3, SEC ID nº 24 y nº 25), seguido del intercambio R74Y (figura 3, SEC ID nº 26) y las sustituciones de R por los residuos aminoácidos alifáticos no polares M, A, G y V (figura 3, SEC ID nº 27, nº 21, nº 28 y nº 29). Los VARIOTOPOS en los que se había sustituido R por un aminoácido con carga negativa (representado por R74D) o aminoácidos no polares aromáticos (W y F) y P, que es un aminoácido disruptor estructural, no resultaron favorables en la inducción de anticuerpos inhibidores de hC5a (figura 4, SEC

ID nº 35 a nº 38).

Ejemplo 3:

5 La histidina en la posición 67 de hC5a era otra posición intercambiable favorable identificada mediante el procedimiento de escaneo de alaninas. Esta posición nuevamente se intercambió sistemáticamente por una diversidad de aminoácidos con características similares o contrarias a las del residuo de histidina (véase la Tabla 3). Se sometieron a ensayo 18 VARIOTOPOS H67X del epítipo C-terminal de 12 aminoácidos de longitud de hC5a para su inmunogenicidad y su capacidad de inducir anticuerpos activos funcionales (SEC ID nº 17 y nº 39 a nº 55).

15 Los sueros inmunológicos obtenidos a partir de los VARIOTOPOS con los intercambios H67T y H67Q mostraron la mejor inhibición en el contexto del ensayo de liberación de glucuronidasa (figura 4, SEC ID nº 39 y nº 40) con un incremento de 20% respecto a la secuencia original (SEC ID nº 2) (figura 4). Los sueros inmunológicos inducidos por los VARIOTOPOS SEC ID nº 41 a nº 47 mostraron actividades de inhibición ligeramente más elevadas o comparables a las de la secuencia original SEC ID nº 2. Se observó un claro efecto negativo sobre la inhibición de hC5a para los sueros inmunológicos inducidos por los VARIOTOPOS SEC ID nº 51 a nº 55, indicado por una reducción de 20 y más por ciento en comparación con la secuencia original (SEC ID nº 2) (figura 4).

20

Ejemplo 4:

25 La metionina en la posición 70 de hC5a fue el siguiente aminoácido que se intercambió sistemáticamente con el fin de definir los VARIOTOPOS que eran capaces de inducir una actividad de inhibición más elevada contra hC5a que el epítipo C-terminal original de 12 aminoácidos de longitud de hC5a. Se sometieron a ensayo 15 VARIOTOPOS y se analizaron para su actividad funcional mediante el ensayo de liberación de glucuronidasa. Los sueros inmunológicos inducidos por los VARIOTOPOS SEC ID nº 18 y nº 56 a nº 62 mostraron señales de inhibición mejores o comparables que el suero inmunológico inducido por el epítipo original SEC ID nº 2 (figura 5). Sin embargo, los VARIOTOPOS SEC ID nº 63 a nº 60 mostraron una caída escalonada de la actividad de inhibición y no resultaron favorables en la inducción de anticuerpos activos funcionales contra hC5a.

30

Ejemplo 5:

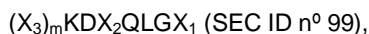
35 Los intercambios de aminoácidos en la posición 74 de hC5a presentan efectos muy grandes sobre la inmunogenicidad de los fragmentos C-terminales de hC5a y en consecuencia también sobre la actividad funcional de los anticuerpos inducidos (véase la figura 3). Sin embargo, este efecto fue todavía más pronunciado al intercambiar la posición 67 o 70 o ambas del epítipo C-terminal de hC5a además de los intercambios favorables en la posición 74. En el experimento siguiente, se generaron VARIOTOPOS que contenían el intercambio R74X y una sustitución adicional en la posición 67 o 70, o en ambas posiciones, respectivamente, y se sometieron a ensayo para su inmunogenicidad. El intercambio H67T, H67M y H67A junto con la sustitución de R en la posición 74 por residuos aminoácidos no polares pequeños (A, M), no cargados polares (Q, S, N) y H con carga positiva ganaron títulos elevados y anticuerpos 1,5 veces más reactivos contra hC5a que el epítipo original SEC ID nº 2 (figura 6, SEC ID nº 70 a nº 80). Los intercambios ventajosos en la posición 74 en combinación con intercambios favorables en la posición 67, tal como H67T, H67M y H67A, o en la posición 70, tal como M70K, M70A y M70V, resultaron en una actividad de inhibición más elevada que la de la secuencia original SEC ID nº 2 (figura 6). Los sueros inmunológicos inducidos por los VARIOTOPOS SEC ID nº 90 a nº 98 no resultaron favorables en comparación con la secuencia original, lo que resulta señalado por una actividad de inhibición reducida (figura 6).

40

45

REIVINDICACIONES

1. Vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en 7 a 19 residuos aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos:



en la que

X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, treonina, tirosina y valina,

X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, tirosina y valina,

X_3 es $(X_4)_n ANISX_5$ (SEC ID n° 100) o un fragmento truncado en el extremo N-terminal del mismo que consiste en 1 a 4 residuos aminoácidos,

X_4 es VVASQLR (SEC ID n° 101) o un fragmento truncado en el extremo N-terminal del mismo que consiste en 1 a 6 residuos aminoácidos,

X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, ácido glutámico, histidina, arginina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina,

m es 0 o 1, y

n es 0 o 1,

en la que dicho por lo menos un péptido se acopla o fusiona a un portador que comprende por lo menos un epítipo de linfocitos T.

2. Vacuna según la reivindicación 1, en la que X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en treonina, glutamina, tirosina, metionina, alanina, glicina y valina.

3. Vacuna según la reivindicación 1, en la que X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, asparagina, glutamina, histidina, lisina, metionina, serina y treonina si m es 1 y X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, histidina, metionina y treonina, preferentemente alanina, treonina o metionina, y/o X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en metionina, alanina, lisina y valina.

4. Vacuna según la reivindicación 1 o 2, en la que m es 1 y X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, histidina, metionina y treonina, preferentemente alanina, treonina o metionina.

5. Vacuna según la reivindicación 1, 2 o 4, en la que X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en metionina, alanina, lisina y valina.

6. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho por lo menos un péptido se selecciona de entre el grupo que consiste en ISHKDMQLGA (SEC ID n° 14), ANISHKDMQLGA (SEC ID n° 21), KDMQLGA (SEC ID n° 22), VVASQLRANISHKDMQLGA (SEC ID n° 23), ANISHKDMQLGT (SEC ID n° 24), ANISHKDMQLGQ (SEC ID n° 25), ANISHKDMQLGY (SEC ID n° 26), ANISHKDMQLGM (SEC ID n° 27), ANISHKDMQLGG (SEC ID n° 28), ANISHKDMQLGV (SEC ID n° 29), ANISHKDMQLGK (SEC ID n° 30), ANISHKDMQLGS (SEC ID n° 31), ANISHKDMQLGH (SEC ID n° 32), ANISHKDMQLGN (SEC ID n° 33), ANISHKDMQLGL (SEC ID n° 34), ANISTKDMQLGA (SEC ID n° 70), ANISTKDMQLGQ (SEC ID n° 71), ANISTKDMQLGS (SEC ID n° 72), ANISTKDMQLGM (SEC ID n° 73), ANISMKDMQLGN (SEC ID n° 74), ANISTKDKQLGM (SEC ID n° 75), ANISTKDMQLGH (SEC ID n° 76), ANISAKDMQLGA (SEC ID n° 77), ANISMKDMQLGA (SEC ID n° 78), ANISTKDKQLGA (SEC ID n° 79), ANISTKDAQLGA (SEC ID n° 80), ANISMKDMQLGS (SEC ID n° 81), ANISTKDVQLGA (SEC ID n° 82), ANISTKDMQLGN (SEC ID n° 83), ANISTKDMQLGK (SEC ID n° 84), ANISMKDMQLGM (SEC ID n° 85), ANISTKDMQLGT (SEC ID n° 86), ANISHKDKQLGK (SEC ID n° 87), ANISMKDMQLGH (SEC ID n° 88), y ANISAKDAQLGA (SEC ID n° 89).

7. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que dicho por lo menos un péptido comprende en su extremo N por lo menos un residuo de cisteína unido directamente o mediante una secuencia espaciadora al mismo.

8. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que el portador que comprende por lo menos un epítipo de linfocitos T es un portador proteínico.

9. Vacuna según la reivindicación 8, caracterizada por que el portador proteínico se selecciona de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa americana (KLH), CRM197, toxoide tetánico (TT), proteína D o toxina diftérica (DT).
- 5
10. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que el compuesto se formula con un adyuvante, preferentemente adsorbido a alumbre.
- 10
11. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la utilización en un procedimiento para tratar y/o prevenir un trastorno mediado por el complemento, en la que el trastorno mediado por el complemento se selecciona de entre el grupo que consiste en una enfermedad inflamatoria, preferentemente una enfermedad inflamatoria crónica, degeneración macular senil (AMD), un trastorno neurodegenerativo, especialmente la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington, asma, aterosclerosis, vasculitis, dermatitis, especialmente soriasis y urticaria, síndrome urémico hemolítico, artritis reumatoide, 15 síndrome de Guillain-Barre, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolípido, síndrome urémico hemolítico, y lupus eritematoso diseminado (SLE); lesión por isquemia/reperfusión, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, sepsis, cáncer, complicaciones del embarazo, tales como la preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes, retraso del crecimiento intrauterino y trombosis asociada a hemodiálisis.

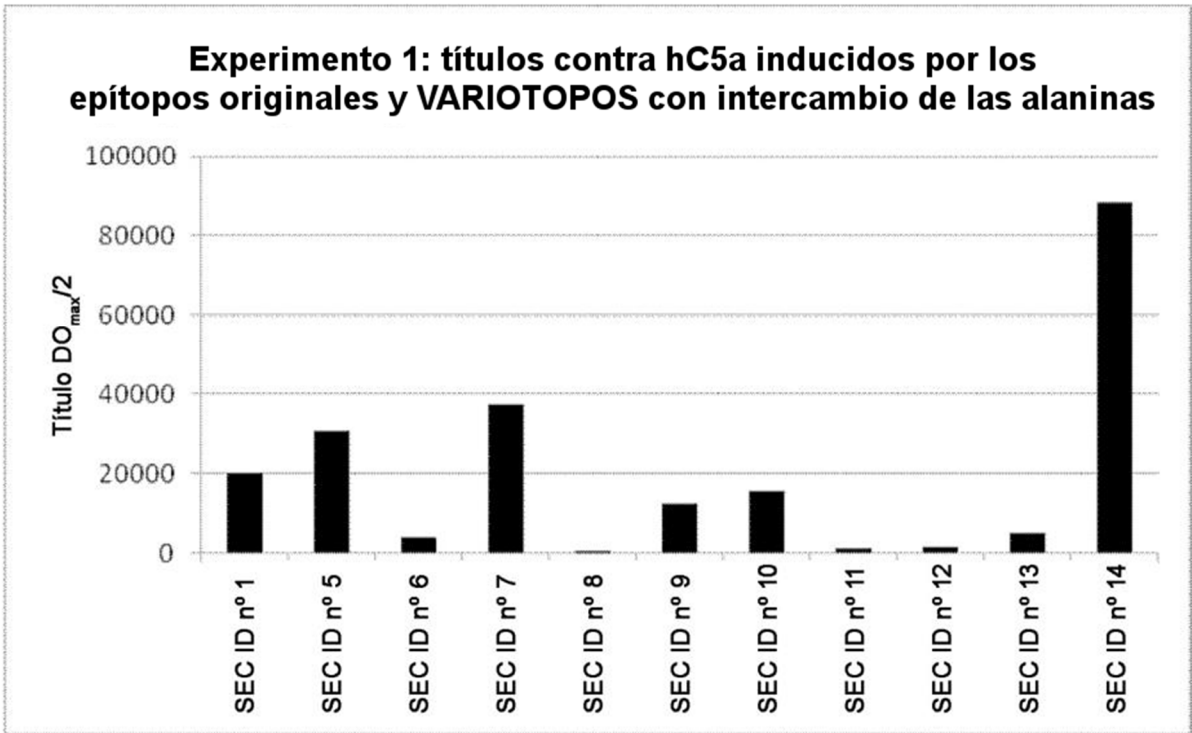


Figura 1A

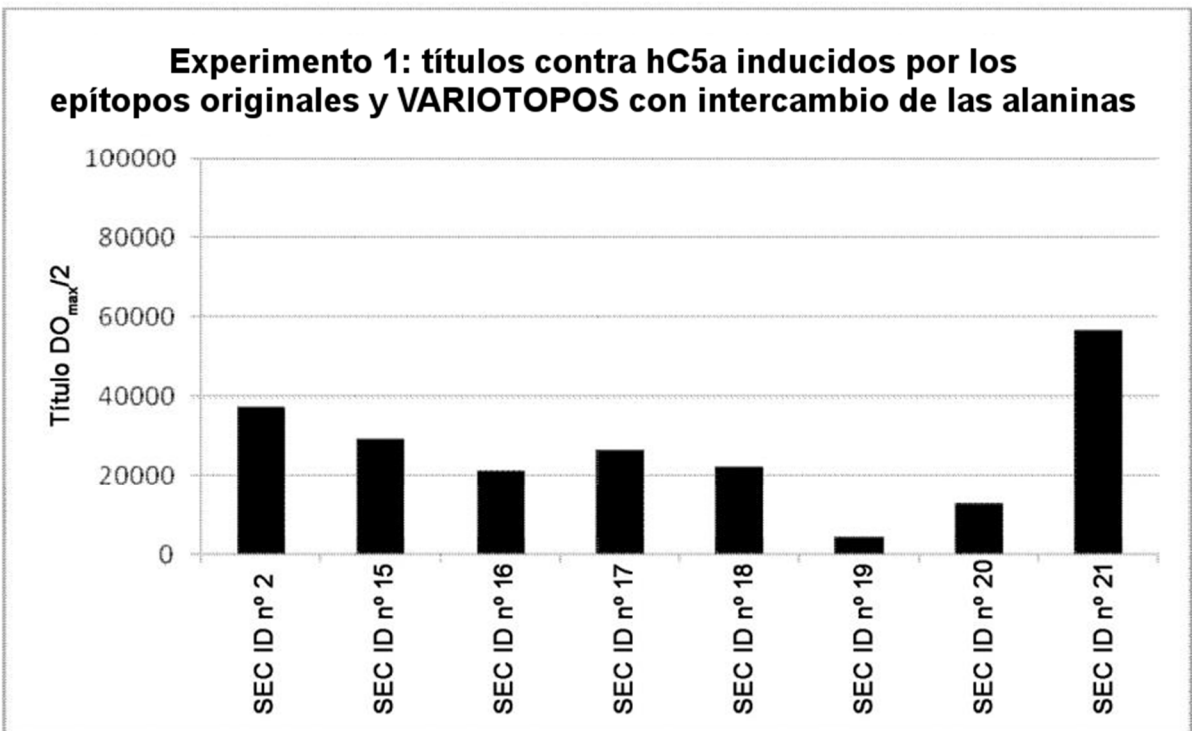


Figura 1B

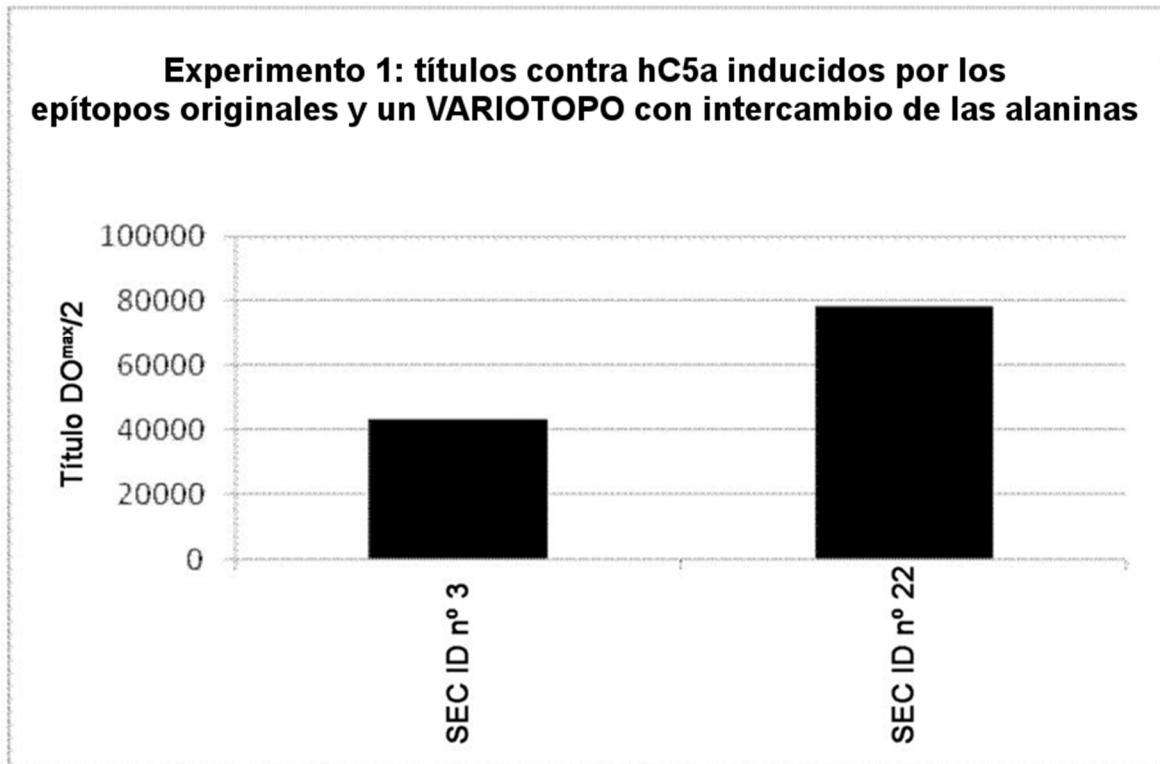


Figura 1C

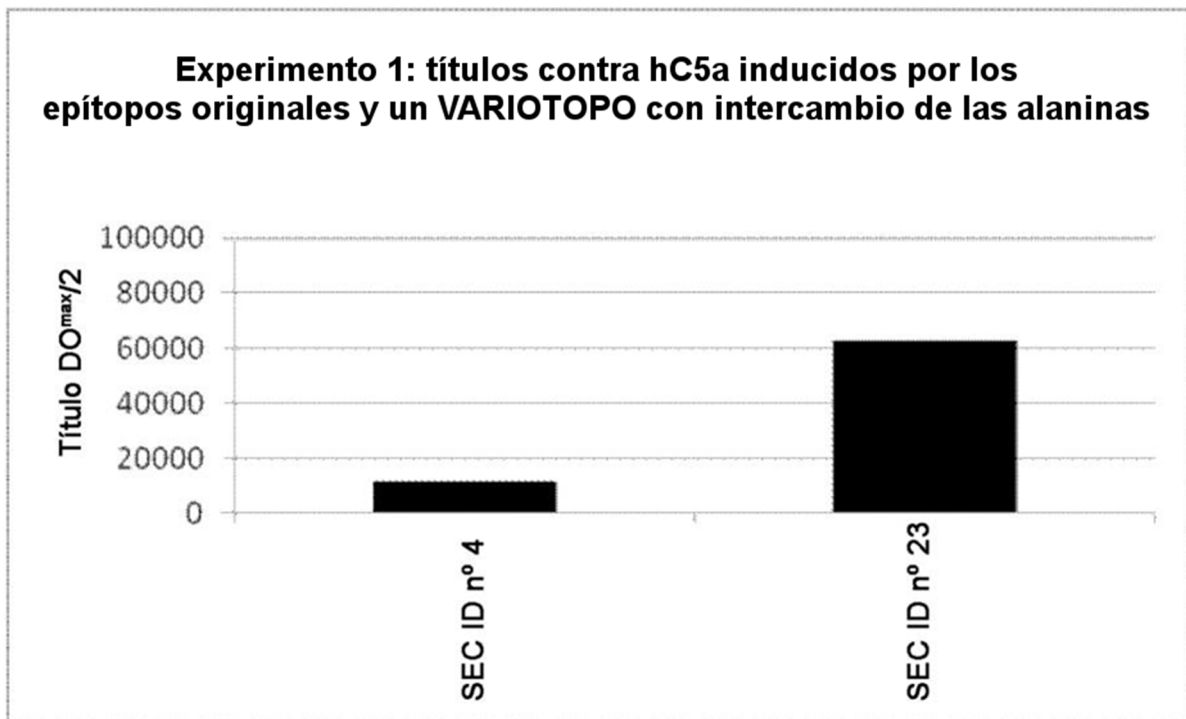


Figura 1D

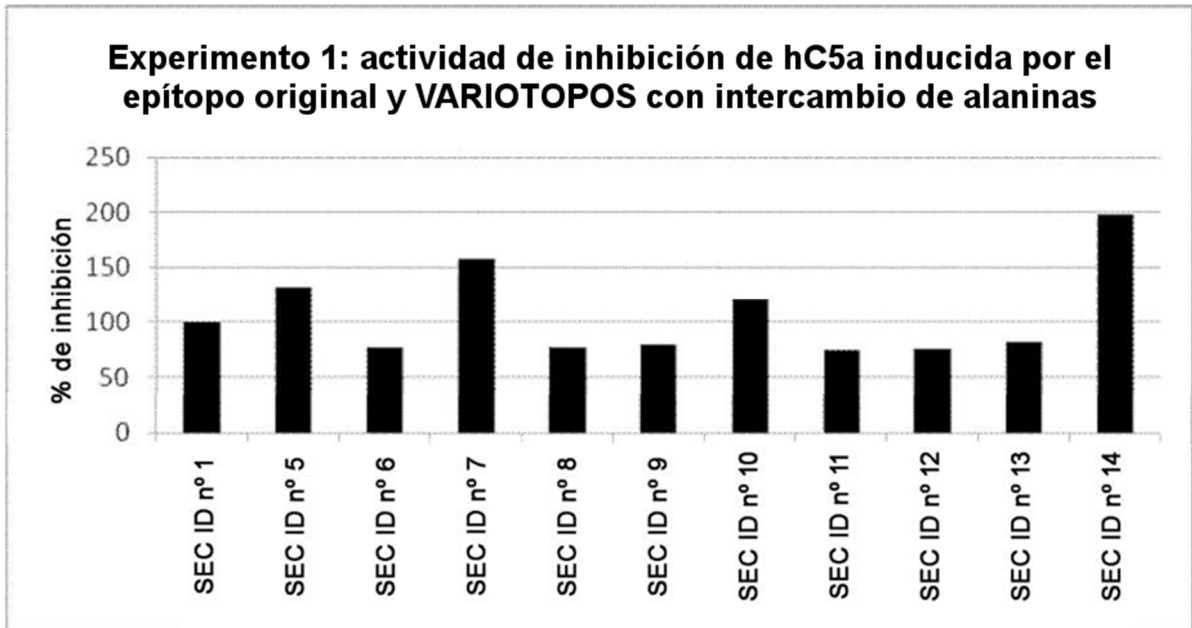


Figura 2A

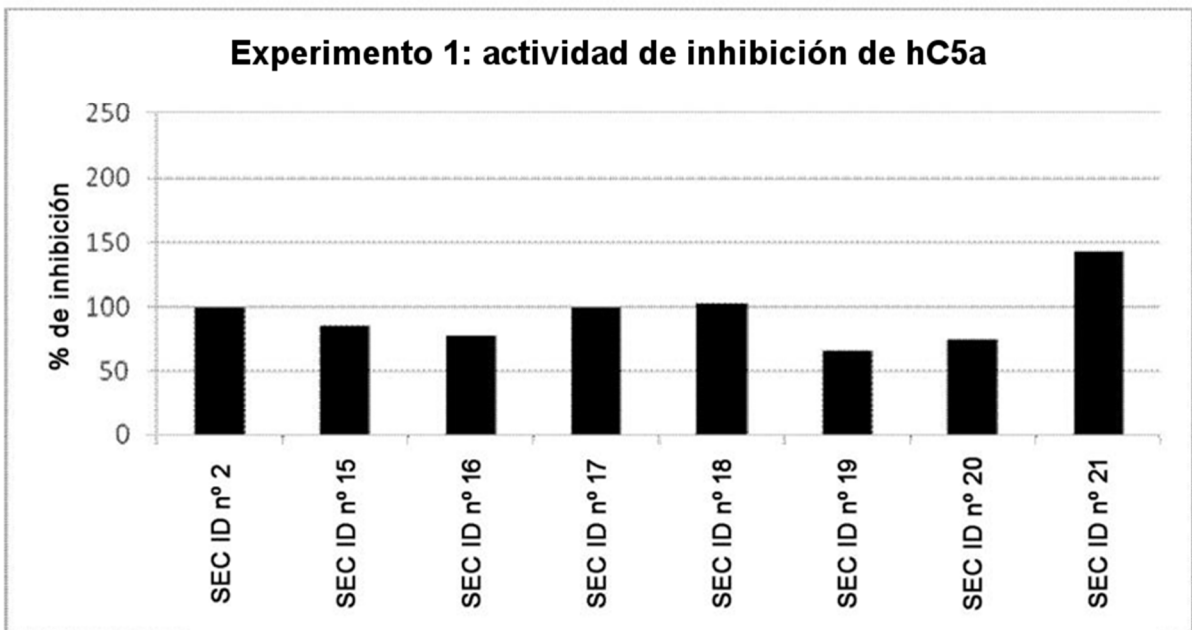


Figura 2B

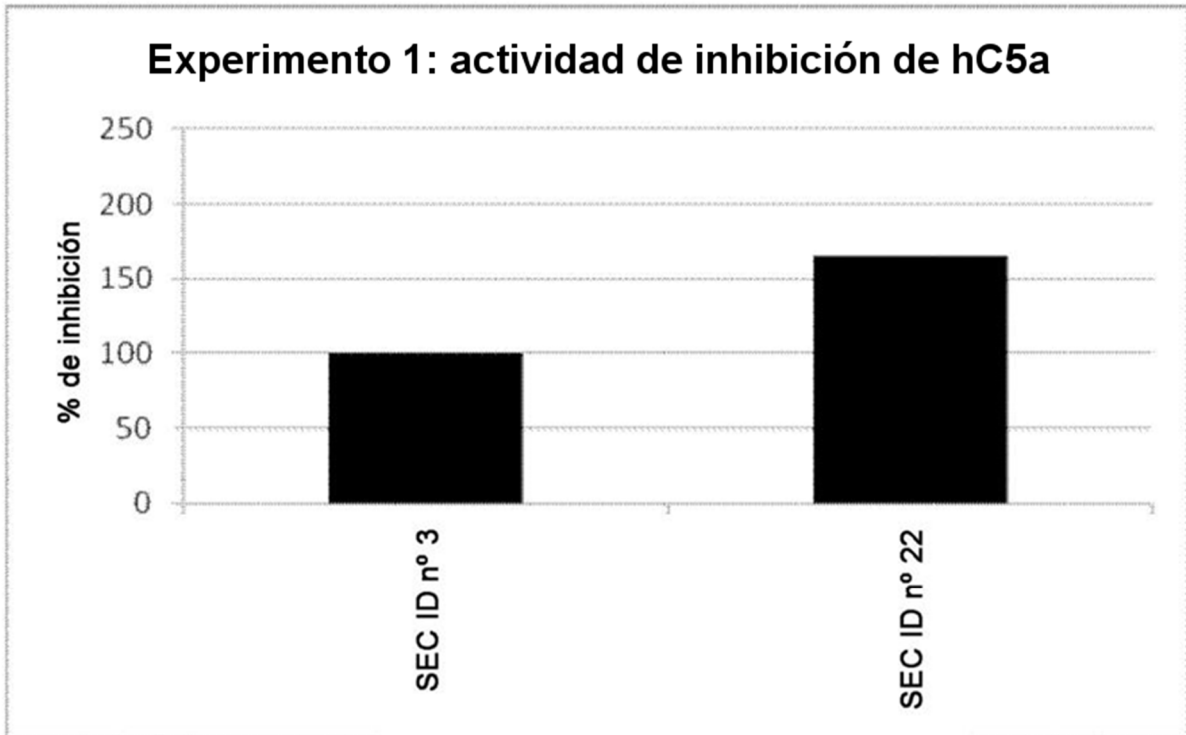


Figura 2C

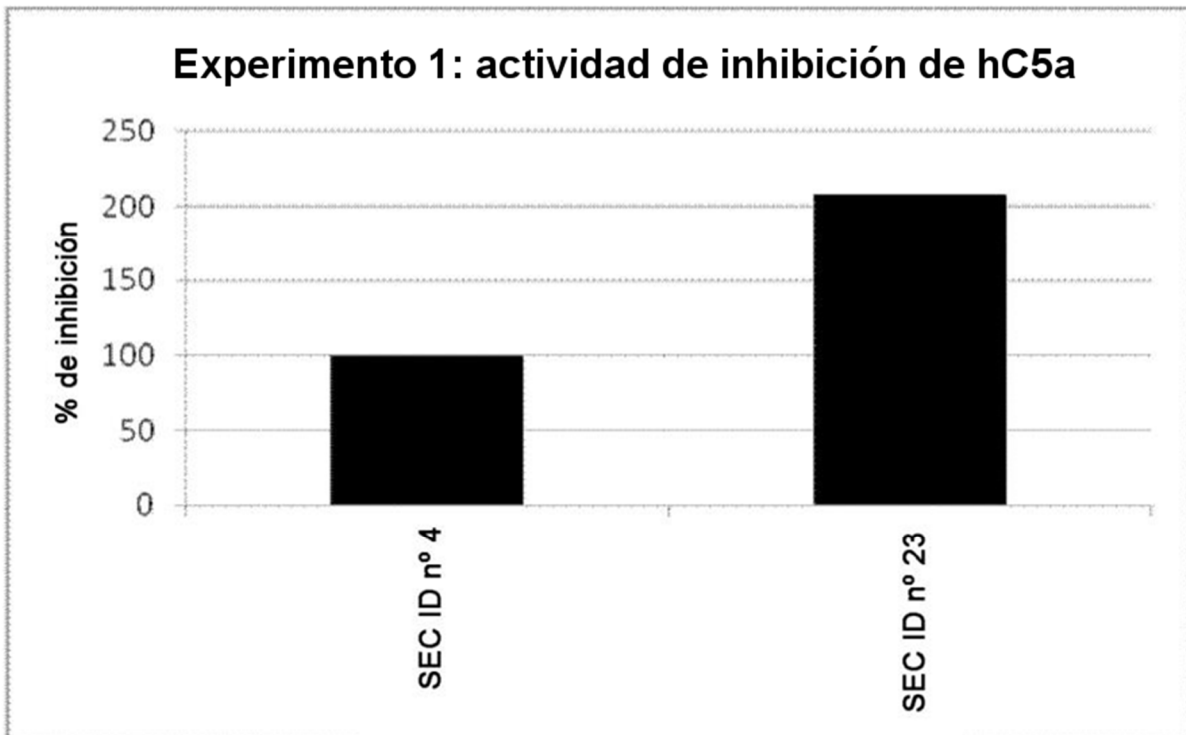


Figura 2D

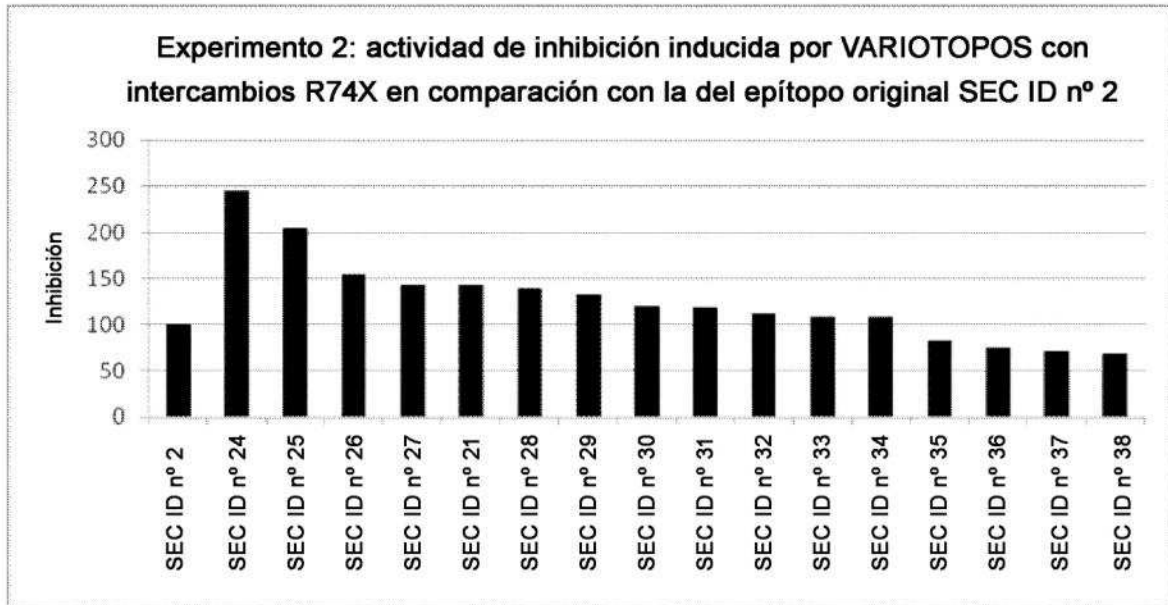


Figura 3

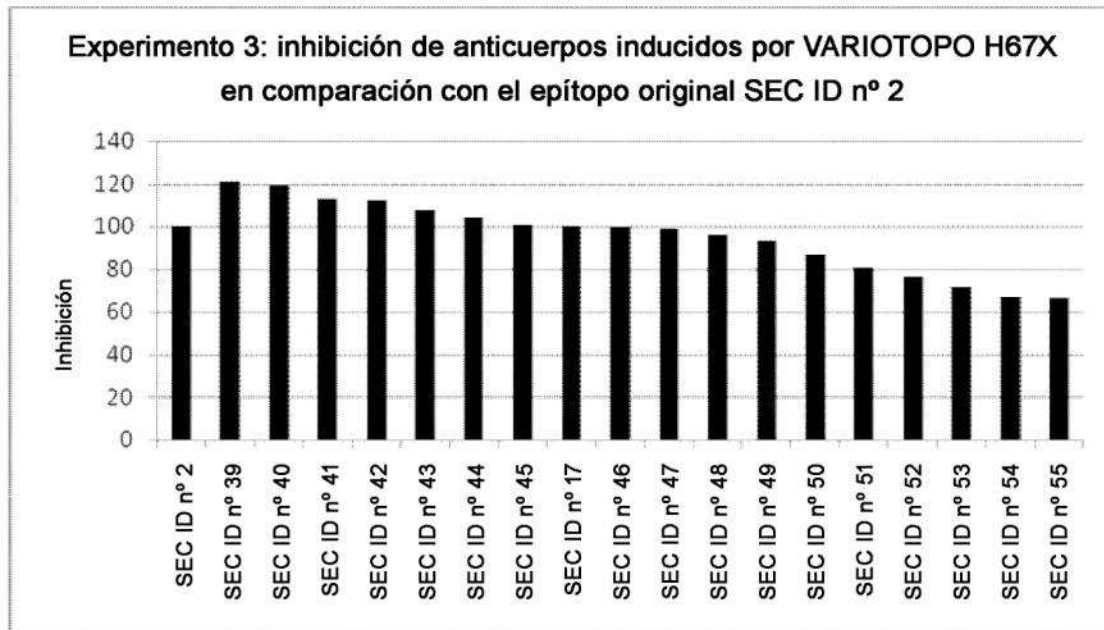


Figura 4

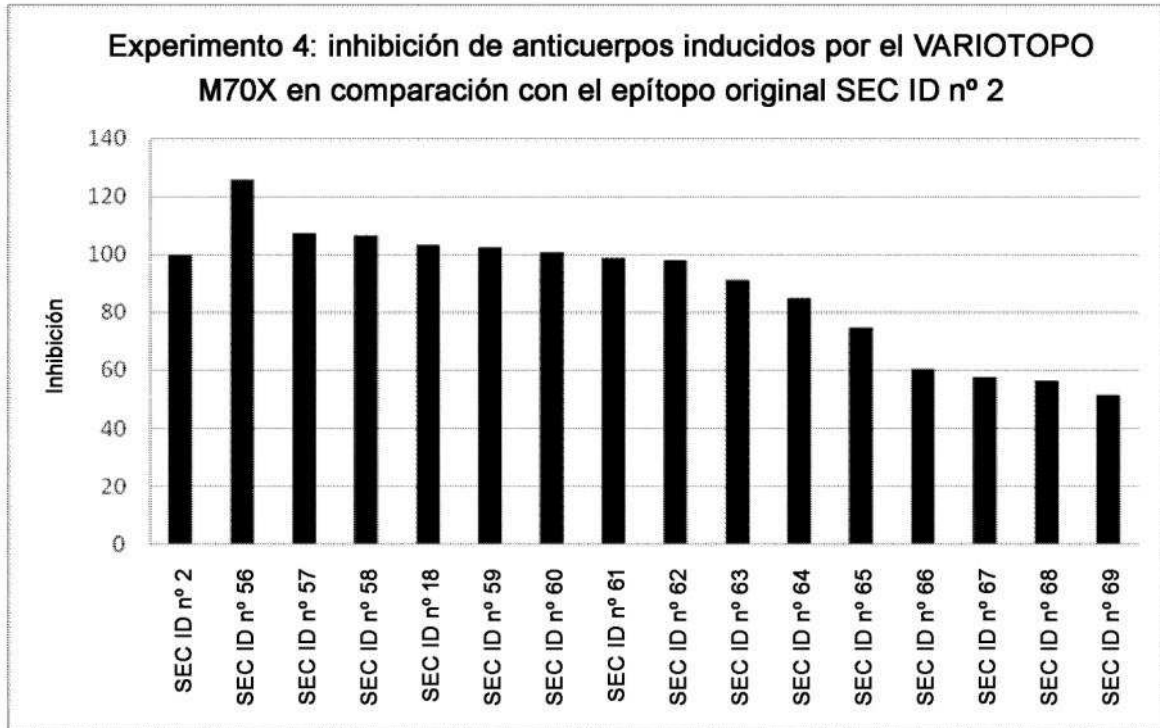


Figura 5

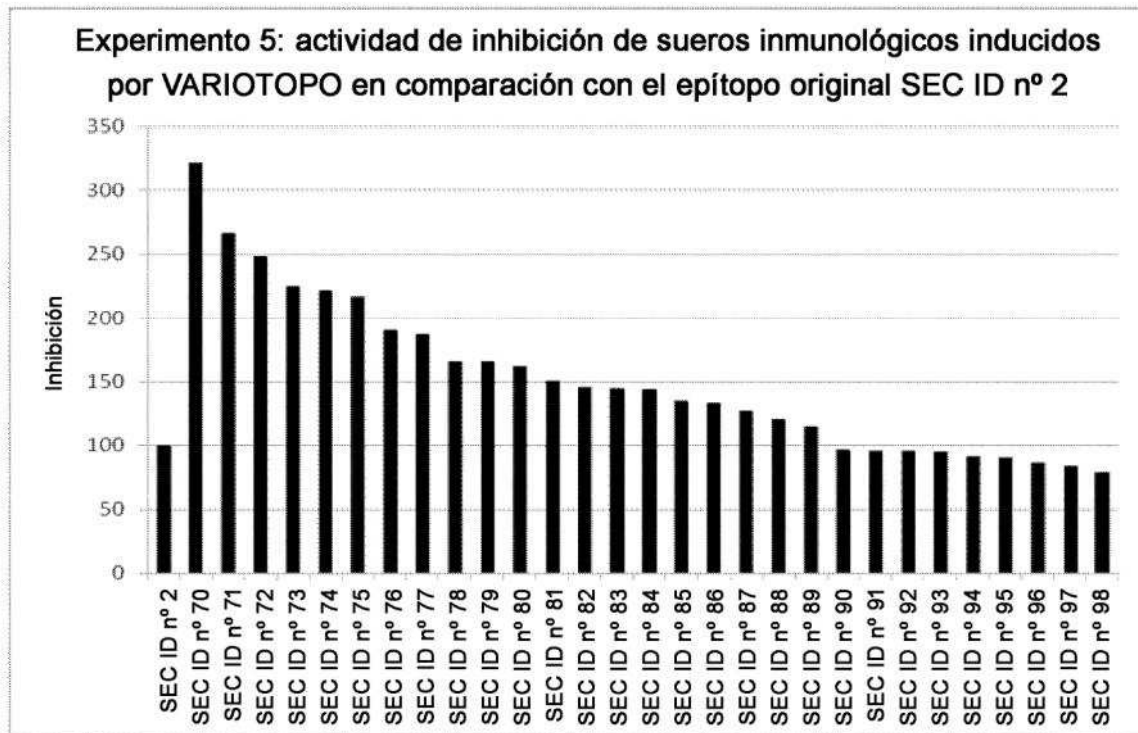


Figura 6