

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 572**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2013 PCT/EP2013/067797**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2013 E 13756108 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2890785**

54 Título: **Vacuna peptídica de PCSK9**

30 Prioridad:

29.08.2012 EP 12182241

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

12.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRUNNER, SYLVIA;
GALABOVA, GERGANA;
WINSAUER, GABRIELE;
BILCIKOVA, ERIKA;
JUNO, CLAUDIA;
LINZMAYER-HIRT, POLA;
SCHUH, BIRGIT y
STAFFLER, GÜNTHER**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

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

ES 2 693 572 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 peptídica de PCSK9.

5 La presente invención se refiere a una vacuna apta para inducir la formación de anticuerpos dirigidos contra PCSK9 *in vivo*.

10 La presente invención se refiere a nuevos péptidos que son aptos para influir en la degradación mediada por proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) (LDLR). Los péptidos están acoplados con un portador inmunógeno y formulados en una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de trastornos de la salud relacionados con PCSK9 causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia o aterosclerosis.

15 Una de las causas principales de muerte en todo el mundo son las enfermedades cardiovasculares (ECV). Se asocian a estas enfermedades factores tales como la hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertensión y aterosclerosis. En estudios epidemiológicos exhaustivos, ha podido demostrarse una correlación positiva entre el nivel sérico de colesterol y la incidencia de ECV. Los niveles elevados de colesterol-LDL (LDLc) constituyen un riesgo cardiovascular elevado y se correlacionan directamente con un riesgo incrementado de aterosclerosis.

20 El LDLR, principalmente el LDLR hepático, es la ruta primaria para la eliminación del LDLc del plasma. El LDLc circulante se une al LDLR y el complejo formado es internalizado por endocitosis mediada por clatrina. Después, mientras el LDLc es dirigido a su degradación, el LDLR se recicla de vuelta a la superficie celular.

25 PCSK9 es una serina proteasa secretada que se une a LDLR y fomenta la degradación del mismo. Se descubrió en 2003 que era el tercer locus génico asociado a hipercolesterolemia dominante autosómica (ADH) La "mutaciones de ganancia de función" (GOF) de PCSK9 potencian su interacción con el LDLR y resultan en una reducción de los niveles de LDLR y en niveles de LDLc marcadamente más elevados. En consecuencia, las GOF se asocian a hipercolesterolemia y a predisposición a aterosclerosis. A la inversa, las "mutaciones de pérdida de función" (LOF) conducen a niveles incrementados de LDLR y drásticamente reducidos de LDLc, con una reducción consecuente del riesgo de enfermedad cardíaca coronaria (CHD). El PCSK9 humano se expresa principalmente en hígado, intestino y riñón. Se sintetiza en forma de una proteína de ~72 kDa que experimenta corte autocatalítico antes de secretarse en forma de una proteína madura de ~65 kDa.

35 El PCSK9 circulante se une específicamente al dominio EGF-A del LDLR. El complejo es internalizado mediante endocitosis y en lugar de reciclar el LDLR de vuelta a la superficie celular, el LDLR es consecuentemente degradado en los lisosomas. El efecto neto de la interacción PCSK9-LDLR es la reducción del LDLR disponible para la eliminación de LDLc del plasma, lo que indica la importancia de PCSK9 como regulador del LDLR y, de esta manera, del metabolismo del LDLc.

40 Varios estudios animales han demostrado el papel esencial de PCSK9 como regulador de los niveles de LDLc. La sobreexpresión adenovírica de PCSK9 en ratones ha conducido a un incremento significativo de LDLc circulante. En contraste, los ratones PCSK9^{-/-} muestran un incremento de 2,8 veces de los niveles de LDLR y una reducción de LDLc a ~50% respecto a animales de tipo salvaje. Las mutaciones GOF y PDF indican el papel importante de PCSK9 en la regulación del metabolismo de LDL en el ser humano, convirtiendo a PCSK9 en una diana atractiva para la intervención farmacológica. Especialmente, el ser humano heterocigótico para mutaciones de PDF en PCSK9 aparentemente son sanos y presentan una esperanza de vida normal. Además, un heterocigoto compuesto con dos mutaciones inactivadoras de PCSK9 y sin PCSK9 circulante se ha informado de que es una madre afroamericana de 31 años sana con niveles muy bajos de LDLc (14 a 34 mg/dl).

50 Se han sometido a ensayo con éxito preclínica y clínicamente varios compuestos que reducen el nivel circulante de PCSK9 o que inhiben su interacción con el LDLR (tales como anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos antisentido o inhibidores de la autocatálisis). Aunque PCSK9 actúa intracelular y extracelularmente sobre LDLR, utilizar como diana el PCSK9 circulante es un enfoque valioso para terapéuticos de reducción del nivel de LDLc. Los experimentos de parabiosis en ratones, así como la administración de proteína recombinante han indicado que el PCSK9 extracelular resulta suficiente para reducir el número de LDLR hepáticos. Más importante, los resultados de estudios clínicos humanos con anticuerpos monoclonales (mAb) específicos de PCSK9 indican que utilizar PCSK9 como diana permite una reducción eficiente y segura del LDLc. Además, se han finalizado con éxito varios ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia del uso de PCSK9 como diana.

60 Los documentos WO 2013/037889 A2, WO 2012/059573 A1 y WO 2011/027257 A2 dan a conocer fragmentos del polipéptido PCSK9 como vacunas. Li *et al.* (Rec. Pat. DNA & Gene Seq. 3:201-212, 2009), Genest (http://www.acclakelouise.com/downloads/slides/2012/1_Sunday/Sunday_03_Genest_New_Lipids_Rx.pdf) y Wierzbicki *et al.* (Exp. Op. Invest. Drugs 21:667-676, 2012) informan de recientes desarrollos en la inhibición de PCSK9 para el tratamiento de la hiperlipidemia.

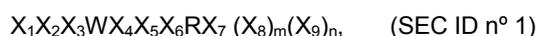
65 En resumen, PCSK9 es un regulador importante del LDLR y, de esta manera, de los niveles de LDLc. Aunque las

estatinas representan la primera línea de intervención para el control del colesterol, las estatinas no resultan suficientes o apropiadas en determinados sujetos para conseguir los objetivos. Además, se encontró que PCSK9 se encuentra regulada positivamente por estatinas, contrarrestando su efecto farmacológico. De acuerdo con lo anterior, la identificación de medicación adicional o alternativa para controlar los niveles de LDLc resulta de gran importancia. La inhibición de PCSK9 se espera que reduzca el LDLc plasmático como monoterapia, aunque también que potencie el efecto reductor del colesterol de las estatinas o de otras sustancias (tales como, por ejemplo, los fibratos o el ácido nicotínico).

Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos para reducir el LDLc en un individuo. Este objetivo puede conseguirse proporcionando péptidos que imitan la secuencia nativa respectiva, denominados mimotopos. Tales mimotopos son capaces de inducir anticuerpos que se unen específicamente a PCSK9 humano e inhiben la degradación mediada por PCSK9 del LDLR.

Por lo tanto, la presente invención se define según las reivindicaciones.

Se da a conocer además una vacuna, composición de vacuna o composición que comprende por lo menos un péptido que consiste en 9 a 25 residuos aminoácidos con la secuencia de aminoácidos:



en la que:

X_1 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en serina, treonina, valina y alanina,

X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de los residuos aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionado de entre el grupo de isoleucina, valina, glicina, glutamina y alanina, más preferentemente isoleucina, valina, glutamina y alanina.

X_3 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en prolina, treonina, alanina y valina, más preferentemente prolina,

X_4 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en asparagina, serina, alanina, glutamina y ácido aspártico,

X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en leucina, glicina, alanina, tirosina, ácido aspártico, fenilalanina y valina, preferentemente leucina,

X_6 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos cargados negativamente hidrófilos, preferentemente un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico,

X_7 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en isoleucina, leucina, alanina y treonina,

X_8 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos no cargados seleccionados de entre el grupo que consiste en treonina, leucina, glutamina, alanina y serina,

X_9 es $X_{10}X_{11}X_{12}$ o un fragmento truncado C-terminal del mismo que consiste en 1 o 2 residuos aminoácidos,

X_{10} es cualquier residuo aminoácido, preferentemente un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de los residuos aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en prolina, alanina y serina,

X_{11} es cualquier residuo aminoácido, preferentemente un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en prolina, alanina, valina, treonina y asparagina,

X_{12} es cualquier residuo aminoácido, preferentemente un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, alanina, lisina, serina y leucina,

m es 0 o 1;

n es 0 o 1, y

SEC ID nº 1 no es SIPWNLERITPPR o un fragmento truncado C-terminal del mismo,

en el que dicho péptido o péptidos se acoplan o se fusionan con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 La vacunación de individuos con los péptidos de la presente invención conduce a la producción de anticuerpos policlonales que se unen a PCSK9. Tales anticuerpos son capaces de competir con la unión de LDLR. En consecuencia, se incrementan los niveles hepáticos de LDLR y se reducen los de LDLc y colesterol total plasmáticos. Por lo tanto, la administración de una vacuna según la presente invención permite tratar o prevenir enfermedades causadas por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis.

10 Los péptidos de la presente invención son los denominados mimotopos. Los mimotopos presentan una secuencia de aminoácidos que es diferente de la secuencia de proteína/péptido original a partir de la que se derivaron. Estos mimotopos son considerados foráneos por el sistema inmunológico y, por lo tanto, no necesitan romper la autotolerancia.

15 Los péptidos de la presente invención son variantes (intercambios de aminoácidos y truncados opcionales) del fragmento de PCSK9 que presenta la secuencia de aminoácidos SIPWNLERITPPR (SEC ID nº 2). Inesperadamente resultó que una modificación (p.ej., una mutación) del residuo triptófano en la posición 4 de la SEC ID nº 2 y del residuo arginina en la posición 8 de la SEC ID nº 2 resulta en la formación de anticuerpos que no pueden unirse suficientemente a PCSK9.

20 Las nuevas secuencias peptídicas según la presente invención, en caso de acoplarse o fusionarse con un portador farmacéuticamente aceptable y formularse como vacunas, son capaces de inducir la formación de anticuerpos dirigidos contra PCSK9 y, por lo tanto, de modificar beneficiosamente la degradación de LDLR mediada por PCSK9 y, de esta manera, de reducir a continuación los niveles plasmáticos de LDLc. Los péptidos definidos con la presente invención también consiguen resultados inesperadamente superiores de reducción de los niveles de colesterol total en comparación con las secuencias de PCSK9 nativas, incluso en comparación con las dadas a conocer en los documentos WO 2012/059573 A1 y WO 2011/027257 A2. Ello se muestra adicionalmente en la sección de ejemplos de la presente solicitud mediante la utilización de un modelo animal representativo.

25 Se da a conocer además un péptido según la SEC ID nº 1 con una longitud de 9 a 13 residuos aminoácidos (es decir, en la que no se encuentra presente X₁₂ y en la que m=1, o en la que m=0 y X₁₀ es prolina, alanina y serina, y X₁₁ es prolina, alanina, valina, treonina y asparagina, y X₁₂ es arginina, alanina, lisina, serina y leucina).

30 Se da a conocer además una vacuna que comprende por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5 o por lo menos 10 péptidos con la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 tal como se define en la presente memoria. La vacuna según la presente invención puede comprender una combinación de dos o más péptidos tal como se da a conocer en la presente memoria. Sin embargo, también resulta posible que una vacuna tal como se da a conocer en la presente memoria comprenda uno o más péptidos dados a conocer en la presente memoria, tal como según la SEC ID nº 1 y tal como se define en la presente memoria también otros péptidos, tales como mimotopos (es decir, mutantes de fragmentos de PCSK9) o fragmentos de PCSK9 (ver, por ejemplo, el documento WO 2011/027257). Son fragmentos particularmente preferentes de PCSK9, fragmentos de SIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGSSLVEV, en particular SIPWNLERIT, SIPWNLERI, SIPWNLERITPPR, SIPWNLERITPP o SIPWNLERITP.

35 Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse químicamente mediante métodos que son bien conocidos de la técnica. Evidentemente también resulta posible producir los péptidos de la presente invención utilizando métodos recombinantes. Los péptidos pueden producirse en microorganismos, tales como bacterias, levaduras u hongos; en células eucarióticas, tales como células de mamífero o insecto, o en un vector vírico recombinante, tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus del bosque de Simliki. Baculovirus, bacteriófagos, virus sindbis o virus Sendai. Entre las bacterias adecuadas para producir los péptidos se incluyen *E. coli*, *B. subtilis* o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar tales péptidos. Entre las células de levadura adecuadas para expresar los péptidos de la presente invención se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastoris* o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los medios y métodos correspondientes son bien conocidos de la técnica. También los métodos para aislar y purificar péptidos producidos recombinantemente 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.

40 Con el fin de facilitar el aislamiento de los péptidos de la presente invención, pueden generarse polipéptidos de fusión, en donde los péptidos se fusionan traduccionalmente (se unen covalentemente) a un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Los polipéptidos heterólogos típicos son la etiqueta de His (por ejemplo, His6: 6 residuos de histidina), etiqueta GST (glutación-S-transferasa), etc. El polipéptido de fusión facilita no sólo la purificación de los péptidos sino que también evita la degradación de los péptidos durante las etapas de purificación. En el caso de que se desee el polipéptido heterólogo después de la purificación, el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de corte en la unión entre el péptido y el

ES 2 693 572 T3

polipéptido heterólogo. El sitio de corte puede consistir en una secuencia de aminoácidos que se corta con un enzima específico para la secuencia de aminoácidos en el sitio (p.ej., proteasas).

5 La vacuna y los péptidos de la presente invención pueden administrarse en cualquier tipo de mamífero, incluyendo seres humanos. Sin embargo, resulta preferente administrar la vacuna y los péptidos de la presente invención en seres humanos.

10 Según una forma de realización preferida de SEC ID nº 1, X₁ es valina, serina, treonina o alanina, preferentemente valina.

Según una forma de realización preferida adicional de SEC ID nº 1, X₂ es valina, alanina, isoleucina o glutamina, preferentemente valina.

15 Según una forma de realización preferida de SEC ID nº 1, X₃ es prolina, treonina, alanina o valina.

X₄ de SEC ID nº 1 es preferentemente serina o asparagina, preferentemente serina.

Según una forma de realización preferida de SEC ID nº 1, X₆ es ácido glutámico.

20 X₇ es preferentemente leucina, isoleucina o treonina, preferentemente treonina.

X₈ es preferentemente glutamina, treonina o leucina.

25 Según una forma de realización preferida de SEC ID nº 1, X₁X₂X₃ se selecciona del grupo que consiste en TIP, VIP, AIP, SVP, SQP, SAP, SGP, SIT, SIA, SIV y VQP.

Según una forma de realización preferida adicional de SEC ID nº 1, X₄X₅X₆ se selecciona del grupo que consiste en SLE, ALE, QLE, DLE, NAE, NGE, NYE, NDE, NFE, NVE y NLD.

30 X₇(X₈)_m, donde m es 1, preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste en LT, TT, AT, IL, IQ, IA, IS, TL, LQ y LL.

35 Según una forma de realización preferida de SEC ID nº 1, X₉ se selecciona del grupo que consiste en PPR, PP, P, APR, SPR, PAR, PVR, PTR, PNR, PPA, PPK, PPS y PPL.

40 Según una forma de realización particularmente preferida de SEC ID nº 1, el péptido o péptidos se seleccionan del grupo que consiste en TIPWNLERIT, TIPWNLERITPPR, VIPWNLERIT, VIPWNLERITPPR, AIPWNLERIT, AIPWNLERITPPR, SVPWNLERIT, SVPWNLERITPPR, SQPWNLERIT, SQPWNLERITPPR, SAPWNLERIT, SAPWNLERITPPR, SGPWNLERITPPR, SGPWNLERIT, SITWNLERIT, SITWNLERITPPR, SIAWNLERIT, SIAWNLERITPPR, SIVWNLERITPPR, SIVWNLERIT, SIPWSLERIT, SIPWSLERITPPR, SIPWALERIT, SIPWALERITPPR, SIPWQLERITPPR, SIPWQLERIT, SIPWDLERITPPR, SIPWDLERIT, SIPWNAERIT, SIPWNAERITPPR, SIPWNGERIT, SIPWNGERITPPR, SIPWNYERIT, SIPWNYERITPPR, SIPWNDERIT, SIPWNDERITPPR, SIPWNFERITPPR, SIPWNVERITPPR, SIPWNDRITPPR, SIPWNFERIT, SIPWNDRIT, SIPWNDRIT, SIPWNLERLT, SIPWNLERLTTPR, SIPWNLERTT, SIPWNLERTTTPR, SIPWNLERAT, SIPWNLERATPPR, SIPWNLERIL, SIPWNLERILPPR, SIPWNLERIQ, SIPWNLERIQPPR, SIPWNLERIA, SIPWNLERIAPPR, SIPWNLERISPPR, SIPWNLERIS, SIPWNLERITAPR, SIPWNLERITSPR, SIPWNLERITPAR, SIPWNLERITPVR, SIPWNLERITPTR, SIPWNLERITPNR, SIPWNLERITPPA, SIPWNLERITPPK, SIPWNLERITPPS, SIPWNLERITPPL, VIPWNLERLT, VIPWNLERLTTPR, VIPWNLERTT, VIPWNLERTTTPR, VIPWNLERIL, VIPWNLERILPPR, VIPWNLERIQ, VIPWNLERIQPPR, SVPWNLERLT, SVPWNLERLTTPR, SVPWNLERTT, SVPWNLERTTTPR, SVPWNLERIL, SVPWNLERILPPR, SVPWNLERIQ, SVPWNLERIQPPR, SIPWSLERTTTPR, SQPWNLERLT, SQPWNLERLTTPR, SQPWNLERIL, SQPWNLERILPPR, SQPWNLERIQ, SQPWNLERIQPPR, SIPWSLERLT, SIPWSLERLTTPR, SIPWSLERTT, SIPWSLERIL, SIPWSLERILPPR, SIPWSLERIQ, SIPWSLERIQPPR, VQPWSLERTL, VQPWSLERTLPPR, SQPWSLERTL, SQPWSLERTLPPR, VQPWNLERLQ, VQPWNLERLQPPR, VQPWSLERLL, VQPWSLERLLPPR, SVPWSLERLT y SVPWSLERLTTPR.

Tabla A: residuos aminoácidos

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
alanina	ala	A
arginina	arg	R
asparagina	asn	N
ácido aspártico	asp	D
cisteína	cys	C
ácido glutámico	glu	E

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
glutamina	gln	Q
glicina	gly	G
histidina	his	H
isoleucina	ile	I
leucina	leu	L
lisina	lys	K
metionina	met	M
fenilalanina	phe	F
prolina	pro	P
serina	ser	S
treonina	thr	T
triptófano	trp	W
tirosina	tyr	Y
valina	val	V

Según una forma de realización particularmente preferida, por lo menos un péptido (SEC ID nº 1) comprendido en la vacuna de la presente invención comprende en su extremo N-terminal y/o C-terminal por lo menos un residuo de cisteína unido directamente o mediante un espaciador a la misma.

5

Este residuo de cisteína puede servir como grupo reactivo para unir el péptido a otra molécula o a un portador. Por ejemplo, este 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 un, 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 máximo de cinco residuos aminoácidos no polares pequeños, tal como glicinas.

10

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el portador se selecciona del grupo que consiste en hemocianina de lapa americana (KLH, por sus siglas en inglés), CRM (preferentemente CRM197), toxoide tetánico (TT), toxina diftérica (TD), proteína D o cualquier otra proteína o péptido que contiene epítomos de células T ayudantes.

15

Según la presente invención, los péptidos SEC ID nº 21, 55 y 60 se acoplan o se fusionan con un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa americana), CRM, toxoide tetánico, proteína de unión a albúmina, albúmina de suero bovino, un dendrímero, conectores peptídicos (o regiones flanqueantes) y puede contener sustancias adyuvantes descritas en Singh *et al.* (Singh *et al.*, Nat. Biotech. 17:1075-1081, 1999 (en particular aquellos en la Tabla 1 de dicho documento) y O'Hagan *et al.* (O'Hagan and Valiante, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9): 727-735, 2003 (en particular los compuestos inmunopotenciadores y sistemas de administración endógenos indicados en dicha referencia) o mezclas de los mismos. La reacción de conjugación (por ejemplo Mediante compuestos heterobifuncionales, tales como GMB y, evidentemente, también otros tal como se indica en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson) en este contexto pueden seleccionarse de entre las reacciones conocidas por el experto en la materia.

20

25

Alternativamente, también resulta posible fusionar el péptido o péptidos de la presente invención con un portador proteína mediante métodos conocidos de la técnica. Tales proteínas comprenden un péptido tal como se indica en la presente memoria junto con una proteína inmunógena no relacionada. Preferentemente, la proteína inmunógena es apta para inducir una respuesta de recuerdo. Entre los ejemplos de tales proteínas se incluyen las proteínas del tétanos, de la tuberculosis y de la hepatitis, y la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria Gram-negativa *Haemophilus influenza* B (documento nº WO 91/18926). Preferentemente, se utiliza un derivado de la proteína D que comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (p.ej., los primeros 100 a 110 aminoácidos N-terminales) y que puede lipidarse. 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, una parte repetida de LYTA puede incorporarse en una proteína de fusión. Una parte repetida se encuentra en la región C-terminal que se inicia en el residuo 178. Una parte repetida particularmente preferente incorpora los residuos 188 a 305.

30

35

40

45

Según una forma de realización preferida de la presente invención, los péptidos según la presente invención (SEC ID nº 21, 55 y 60) se formulan con un adyuvante, preferentemente adsorbidos a hidróxido de aluminio.

50

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 como MF59, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, citoquinas (p.ej., IL-2, IL-12, GM-CSF), saponinas (p.ej., QS21), derivados de MDP, oligonucleótidos CpG, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (p.ej., de Freund, SAF), liposomas, virosomas, iscoms, cocleatos, micropartículas de PLG, partículas de poloxámero, partículas de tipo vírico, enterotoxina termolábil (LT), toxina del cólera (TC), toxinas mutantes (p.ej., 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); también pueden utilizarse como adyuvantes, 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 acilados; polisacáridos derivados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil-lípido A y quil-A. Citoquinas, tales como GM-CSF, o interleuquina-2, 7 o 12.

Entre los adyuvantes preferidos 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 (ver, por ejemplo, Ribi *et al.*, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxinas, Plenum Publ. Corp., NY, 407-419, 1986; y las patentes n° GB 2122204B, n° GB 2220211 y n° US 4.912.094). Una forma preferente de 3D-MPL es una emulsión con un tamaño de partícula pequeño, con un diámetro inferior a 0,2 µm y su método de fabricación se da a conocer en el documento n° WO 94/21292. Se han descrito formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo 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. Los adyuvantes MPL se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US n° 4.436.727, US n° 4.877.611, US n° 4.866.034 y US n° 4.912.094.

Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente de Th1. CpG es una abreviatura de motivos dinucleótido citosina-guanosina presentes en el ADN. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen en, por ejemplo, los documentos WO 96/02555 y WO 99/33488, y en las patentes US n° 6.008.200 y US n° 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también se describen en, por ejemplo, Sato *et al.*, Science 273:352, 1996. CpG formulado en vacunas se administra generalmente libre en solución junto con antígeno libre (documento n° WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente con un antígeno (documento n° WO 98/16247) o formulado 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 de las mucosas (documento WO 96/02555, patente n° 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 preferido es una saponina o mimético o derivado de saponina, preferentemente QS21 (Aqila Biopharmaceuticals Inc.), que puede utilizarse solo o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema potenciado 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 reactógena 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 incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite-en-agua se describe en el documento WO 95/17210. Entre los adyuvantes de saponina adicionales de utilización en la presente invención se incluyen QS7 (descrito en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711) y QS17 (descrito en la patente US n° 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1).

Entre otros adyuvantes preferentes se incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (p.ej., SBAS-2, AS2', AS2, SBAS-4, o SBAS6, disponibles de GlaxoSmithKline), Detox (Corixa), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros 4-fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGP). Entre los adyuvantes de ejemplo adicionales se incluyen MPL sintéticos y adyuvantes basados en la subunidad B de la toxina Shiga (ver el documento n° WO 2005/112991). Resulta particularmente preferente utilizar hidróxido de aluminio como adyuvante.

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

Una vacuna que comprende un péptido de la presente invención y el portador farmacéuticamente aceptable puede administrarse mediante cualquier modo de aplicación adecuado, por ejemplo por vía intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intranasal, oral, subcutánea (s.c.), etc., y en cualquier dispositivo de administración adecuado (O'Hagan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2(9):727-735, 2003). Los péptidos de

la presente invención se formulan preferentemente para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular. Los medios y métodos para obtener las formulaciones respectivas son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc, 2004).

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

Tal como se ha descrito de manera general, los péptidos de la presente invención son capaces de inducir la formación de anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a PCSK9. La interacción de los anticuerpos con PCSK9 conduce al incremento del receptor de lipoproteínas de baja densidad en los hepatocitos del hígado *in vivo*, a una incorporación incrementada del colesterol en plasma y la consiguiente reducción de los niveles plasmáticos de colesterol-LDL y, de esta manera, de los niveles totales de colesterol.

La enfermedad asociada a la aterosclerosis preferentemente se selecciona del grupo que consiste en enfermedad oclusiva arterial periférica, enfermedad cardíaca coronaria, infarto cerebral apoplético y accidente cerebrovascular.

La expresión "enfermedades asociadas a hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" y "trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" se refiere a enfermedades que son una consecuencia de hiperlipidemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis. Entre estas enfermedades se incluyen, entre otras, la enfermedad oclusiva arterial periférica y el infarto cerebral apoplético (ver, p.ej., Steinberg D., J. Lipid Res. 46:179-190, 2005 y Steinberg D., J. Lipid Res. 47:1339-1351, 2006).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, los péptidos de la presente invención se administran en un mamífero o en un individuo en una cantidad de 0,1 ng a 10 mg, preferentemente de 0,5 a 500 µg, más preferentemente de 1 a 100 µg por cada inmunización. En una forma de realización preferente, dichas cantidades se refieren a todos los péptidos (en caso de utilizar más de un péptido en la vacuna) presentes en la vacuna. En otra forma de realización preferente, dichas cantidades se refieren a cada fragmento individual presente en la vacuna. Evidentemente resulta posible proporcionar una vacuna en la que los péptidos se encuentran presentes en cantidades diferentes o iguales. Sin embargo, el péptido de la presente invención puede alternativamente administrarse en un mamífero o individuo en una cantidad de 0,1 ng a 10 mg, preferentemente de 10 ng a 1 mg, en particular de 100 ng a 300 µg/kg de peso corporal.

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

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

La vacuna de la presente invención puede comprender además antígenos derivados de otras proteínas que también participan en la regulación de los niveles de LDL y/o HDL en el cuerpo humano. Por ejemplo, los fragmentos de PCSK9 de la presente invención pueden combinarse con epítomos derivados de la proteína CETP humana. La vacuna de la presente invención puede comprender además antígenos derivados de un epítomo diferente de la proteína PCSK9.

Típicamente, la vacuna contiene los péptidos de la presente invención en una cantidad de 0,5 a 500 µg, preferentemente de 1 a 100 µg y alternativamente de 0,1 ng a 10 mg, preferentemente de 10 ng a 1 mg, en particular de 100 ng a 100 µg, o alternativamente, p.ej., de 100 fmoles a 10 µmoles, preferentemente de 10

pmoles a 1 μ mol, en particular de 100 pmoles a 100 nmoles. Típicamente, la vacuna puede contener además sustancias auxiliares, p.ej., tampones, estabilizadores, etc.

5 Todavía otro aspecto de la presente exposición se refiere a un método para tratar un individuo que sufre o que está en riesgo de sufrir de aterosclerosis o una enfermedad asociada a aterosclerosis durante el curso de la cual un péptido o vacuna según la presente invención se administra en dicho individuo.

10 Junto con la vacuna de la presente invención, el individuo que debe tratarse puede recibir también otros principios activos que es conocido que influyen sobre los niveles de LDL y/o HDL en el ser humano y en los mamíferos, tales como estatinas, fibratos, ácido nicotínico, inhibidor de la incorporación del colesterol (p.ej., ezetimibe), ApoA1 Milano, HDL deslipidado o esteroides vegetales. Resulta particularmente preferente administrar en el individuo la vacuna de la presente invención junto con (es decir, simultáneamente, consecutivamente, etc.) con estatinas. La vacuna de la presente invención puede combinarse además con métodos como la aféresis de LDL. La aféresis de LDL es una forma de aféresis para eliminar las partículas de colesterol-lipoproteína de baja densidad (LDL) del torrente sanguíneo. Típicamente, la aféresis de LDL funciona conduciendo sangre venosa por una columna recubierta con anticuerpos contra la apolipoproteína B (la proteína principal de las partículas de LDL), sulfato de dextrano o poliacrilato, o mediante precipitación del LDL con heparina a pH bajo. Los métodos respectivos son conocidos por el experto en la materia.

20 El término "prevenir", tal como se utiliza en la presente memoria, cubre medidas no sólo para evitar la incidencia de la enfermedad, tal como la reducción de los factores de riesgo, sino también para detener su avance y reducir sus consecuencias una vez establecida.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" o equivalentes gramaticales comprende la mejora y/o reversión de los síntomas de la enfermedad. Un compuesto que causa una mejora en cualquier parámetro asociado a la enfermedad utilizado en los métodos de cribado de la presente invención puede identificarse de esta manera como compuesto terapéutico. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Por ejemplo, entre aquellos que pueden beneficiarse del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención se incluyen aquellos ya con una enfermedad y/o trastorno, así como aquellos en los que debe prevenirse una enfermedad y/o trastorno (p.ej., utilizando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3WX_4X_5X_6RX_7(X_8)_m(X_9)_n$ (SEC ID n° 1) tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las formas de realización, figuras y ejemplo a continuación, aunque sin limitarse a los mismos.

40 Figura 1 ELISA de unión

La figura 1 representa la detección de secuencias de mimotopo de PCSK9 por sueros de ratón que contienen anticuerpos policlonales específicos para PCSK9 humana aa 153 a 162 o a 153 a 165.

- 45 A) Mimotopos que contienen intercambios únicos
B) Mimotopos que contienen múltiples intercambios

50 Los gráficos muestran medianas de títulos de todos los mimotopos comparados con el control negativo irrelevante. Como control positivo, se incluye la secuencia de PCSK9 humana original: aa 153 a 162 o aa 153 a 165. Los mimotopos con valores superiores a 1:50.000 se consideran buenos candidatos.

55 Figura 2 ELISA de competición

La figura 2 muestra la capacidad de los mimotopos de PCSK9 de competir con la secuencia de PCSK9 original (aa 153 a 162 o aa 153 a 165) para la unión de anticuerpos policlonales en sueros de ratón generados específicamente contra estos últimos.

Todos los mimotopos se comparan con el grupo negativo (0% de competición por un péptido irrelevante). Como control positivo para cada ELISA de competición, se utilizaron las secuencias de PCSK9 originales (aa 153 a 162 o aa 153 a 165).

- 60 A) Mimotopos que contienen intercambios únicos
B) Mimotopos que contienen múltiples intercambios

65 Los gráficos muestran la capacidad (en porcentaje) de los mimotopos de competir con la secuencia de PCSK9 original (aa 153 a 162 o aa 153 a 165) para la unión de anticuerpos policlonales generados contra estos últimos.

Los mimotopos con una capacidad de competición superior a 20% se consideran buenos candidatos.

Figura 3 ELISA de proteínas

5 La figura 3 muestra una comparación entre las medianas de títulos (n=5 ratones/grupo) contra la proteína PCSK9 humana inducida por las secuencias indicadas. Los datos revelan la capacidad de los mimotopos de inducir la reacción cruzada de anticuerpos con la proteína PCSK9 humana. Los anticuerpos generados por un péptido irrelevante no reconocen la proteína.

10 Figura 4 Colesterol total (% respecto al grupo de control)

La figura 4 muestra una comparación del nivel medio (n=5 ratones/grupo) de colesterol total de los ratones inmunizados con mimotopos en comparación con un grupo de control inmunizado con péptido irrelevante. Los datos revelan la capacidad de los mimotopos de reducir sustancialmente los niveles de colesterol total en los ratones hasta en aproximadamente 30%.

Figura 5 Niveles de colesterol total (TC) tras la vacunación

20 La figura 5 muestra los niveles de colesterol total (TC) tras la vacunación con la secuencia de PCSK9 original, SIPWNLERIT y la nueva secuencia SIPWSLERIT (comparación directa).

Figura 6 Niveles de colesterol total (TC) tras la inmunización

25 La figura 6 muestra los niveles de colesterol total (TC) tras la inmunización con vacunas que contienen las nuevas secuencias SIPWSLERIT, VIPWNLERIL y SVPWNLERIQ.

Ejemplos

Materiales y métodos:

30

Vacuna:

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

35

Experimentos de animales:

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

40

Los ratones recibieron cuatro inyecciones a intervalos de 2 semanas, de 15 µg de péptido neto acoplado con KLH y adsorbido a Alhydrogel como adyuvante en un volumen total de 1 ml.

45

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

ELISA de competición:

50 Se incubaron 20 µg de cada péptido indicado con sueros procedentes de ratones en los que se había inyectado la secuencia de PCSK9 original (aa 153 a 162 o aa 153 a 165: SEC ID nº 2). A continuación, se incubaron los sueros en placas de ELISA recubiertas con la secuencia de PCSK9 original (aa 153 a 162 o aa 153 a 165: SEC ID nº 2). La detección se llevó a cabo con anticuerpos anti-IgG de ratón, se utilizó ABTS como sustrato cromógeno y se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm.

55 Los mimotopos que reducían >20% la unión posterior de los anticuerpos policlonales de los sueros al epítipo de PCSK9 humano original (aa 153 a 162 o 153 a 165: SEC ID nº 3) utilizados para recubrir las placas de ELISA se consideraron mimotopos de competición y buenos candidatos.

ELISA de unión:

60

Se utilizaron los mimotopos para recubrir placas de ELISA a una concentración de 1 µmol/ml. Tras bloquear la unión no específica (BSA al 1% en PBS), se añadieron diluciones apropiadas de sueros procedentes de ratones en los que se había inyectado la secuencia de PCSK9 humana original, aa 153 a 162 o aa 153 a 165 (SEC ID nº 3) y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Después, se llevó a cabo la detección con anticuerpos anti-IgG de ratón. Se utilizó ABTS como sustrato. Las mediciones de DO se llevaron a cabo a 405 nm y los títulos se definieron como la dilución del suero a la que se alcanza 50% de la DOMax.

65

ELISA de proteínas:

5 Con el fin de determinar la inmunogenicidad de las vacunas, las placas de ELISA se recubrieron con proteína PCSK9 humana expresada recombinantemente. Se bloqueó la unión no específica mediante incubación con tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS). Se añadieron a los pocillos diluciones apropiadas del suero, se diluyeron en serie 1:2 veces y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón; se añadió ABTS como sustrato y se midió la DO a 405 nm. Como control negativo, se analizaron sueros del grupo de control en los que se había inyectado un péptido irrelevante. Los títulos se definieron como la dilución del suero a la que se alcanzaba 50% de la D_{Omax} en el ensayo.

Ensayo de colesterol total:

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

Resultados

20 Ejemplo 1: Lista de secuencias y medianas de títulos de anticuerpo contra la secuencia de PCSK9 humana original (ver las figuras 1A y 1B) y capacidad de competición (en porcentaje) de los mimotopos, en comparación con el grupo de control negativo (ver las figuras 2A y 2B). Con el fin de facilitar el acoplamiento de los péptidos a KLH, los péptidos pueden comprender un residuo de cisteína como conector en el extremo C-terminal.

Sec ID	Secuencia	ELISA de unión de la mediana de título (D _{Omax} /2)	% de competición en comparación con el grupo de control relacionado
1	X ₁ X ₂ X ₃ WX ₄ X ₅ X ₆ RX ₇ (X ₈) _m (X ₉) _n		
2	SIPWNLERITPPR		
3	ERTKSDPGAQHREF (control negativo)		0
4	ITELSRWPNI (control negativo)		0
5	TIPWNLERIT	198.000	52
6	VIPWNLERIT	152.000	51
7	AIPWNLERIT	199.000	83
8	SVPWNLERIT	197.000	62
9	SQPWNLERIT	149.000	30
10	SAPWNLERIT	131.000	76
11	SGPWNLERITPPR	81.000	54
12	SITWNLERIT	124.000	62
13	SIWNLERIT	147.000	78
14	SIVWNLERITPPR	146.000	78
15	SIPFNLERIT	42.000	15
16	SIPANLERIT	22.000	8
17	SIPGNLERIT	21.000	0
18	SIPHNLERIT	23.000	0
19	SIPDNLERIT	23.000	3
20	SIPSNLERIT	22.000	7
21	SIPWSLERIT	147.000	73
22	SIPWALERIT	157.000	75
23	SIPWQLERITPPR	224.000	79
24	SIPWDLERITPPR	231.000	74
25	SIPWNAERIT	156.000	73
26	SIPWNGERIT	56.000	52
27	SIPWNYERIT	115.000	76
28	SIPWNDERIT	131.000	71
29	SIPWNFERITPPR	186.000	79
30	SIPWNVERITPPR	197.000	78
31	SIPWNLARIT	34.000	13
32	SIPWNLDRITPPR	151.000	53
33	SIPWNLEKIT	59.000	19
34	SIPWNLEAIT	54.000	15
35	SIPWNLEDIT	48.000	13
36	SIPWNLERLT	192.000	76
37	SIPWNLERTT	177.000	73
38	SIPWNLERAT	149.000	77

Sec ID	Secuencia	ELISA de unión de la mediana de título (DO _{max} /2)	% de competición en comparación con el grupo de control relacionado
39	SIPWNLERIL	168.000	56
40	SIPWNLERIQ	181.000	64
41	SIPWNLERIA	189.000	80
42	SIPWNLERISPPR	219.000	79
43	SIPWNLERITAPR	226.000	70
44	SIPWNLERITSPR	153.000	68
45	SIPWNLERITPAR	184.000	74
46	SIPWNLERITPVR	265.000	75
47	SIPWNLERITPTR	155.000	73
48	SIPWNLERITPNR	186.000	70
49	SIPWNLERITPPA	163.000	65
50	SIPWNLERITPPK	158.000	66
51	SIPWNLERITPPS	149.000	66
52	SIPWNLERITPPL	139.000	66
53	VIPWNLERLT	191.000	54
54	VIPWNLERTT	162.000	69
55	VIPWNLERIL	173.000	49
56	VIPWNLERIQ	166.000	47
57	SVPWNLERLT	154.000	57
58	SVPWNLERTT	116.000	73
59	SVPWNLERIL	188.000	59
60	SVPWNLERIQ	222.000	61
61	SQPWNLERLT	200.000	69
62	SQPWNLERIL	196.000	69
63	SQPWNLERIQ	167.000	66
64	SIPWSLERLT	164.000	46
65	SIPWSLERTT	147.000	64
66	SIPWSLERIL	199.000	46
67	SIPWSLERIQ	223.000	44
68	VQPWSLERTL	95.000	48
69	SQPWSLERTL	98.000	53
70	SVPWNLEKLT	47.000	11
71	VQPWNLERLQ	184.000	72
72	VQPWSLERLL	166.000	66
73	SVPWSLERLT	251.000	74

Ejemplo 2: efecto inesperado de los péptidos según la presente invención

5 En un experimento adicional, se investigó la funcionalidad de los anticuerpos generados con la inmunización con las vacunas de péptido según la presente invención. En el presente experimento, la funcionalidad altamente significativa de los anticuerpos generados mediante la inmunización con vacunas que contenían las nuevas secuencias (SEC ID nº 21 SIPWSLERIT, SEQ ID nº 55 VIPWNLERIL y SEC ID nº 60 SVPWNLERIQ) se demuestra en comparación con los anticuerpos generados tras la vacunación con vacunas que contenían la secuencia de PCSK9 original (SIPWNLERIT) y una secuencia de control negativo - todos acoplados con el mismo portador, KLH (figuras 5 y 6).

10 Con este fin, los ratones fueron inmunizados con péptidos purificados mediante HPLC acoplados con KLH y formulados con un adyuvante (alúmina) como vacunas (secuencia-KLH/alúmina). En el primer experimento, se llevó a cabo una comparación directa entre la secuencia de PCSK9 original y la nueva secuencia SIPWSLERIT. 15 En este experimento, se inmunizaron ratones con la vacuna de péptido irrelevante (péptido irrelevante-KLH/alúmina) como grupo de control negativo, vacuna de secuencia de PCSK9 original (SIPWNLERIT-KLH/alúmina) y la vacuna de nueva secuencia (SIPWSLERIT-KLH/alúmina). El último grupo (SIPWSLERIT-KLH/alúmina) se utilizó no sólo para comparar la funcionalidad de los anticuerpos inducidos con la funcionalidad de los anticuerpos generados utilizando la vacuna de secuencia de PCSK9 original (SIPWNLERIT-KLH/alúmina), sino también como grupo puente entre diferentes experimentos. Tal como se muestra, ambas vacunas, la vacuna de secuencia de PCSK9 original (SIPWNLERIT-KLH/alúmina) y la vacuna de nueva secuencia (SIPWSLERIT-KLH/alúmina) fueron capaces de reducir fuertemente los niveles de colesterol total en comparación con el grupo de control negativo (figuras 5a y 5b). Sin embargo, curiosamente, tras la vacunación con la vacuna de nueva secuencia (SIPWSLERIT-KLH/alúmina), los ratones mostraban una reducción significativa del colesterol total en comparación no sólo con el grupo de control negativo sino, de hecho, también en comparación con el grupo en el que se habían inyectado vacunas que contenían la secuencia de PCSK9 original, SIPWNLERIT (figuras 5a y 5b).

A continuación, se llevó a cabo un segundo experimento en el que los ratones se inmunizaron con péptido irrelevante como grupo de control negativo y la totalidad de las tres nuevas secuencias, SIPWSLERIT, VIPWNLERIL y SVPWNLERIQ, todas acopladas con KLH y formuladas como vacunas. Tal como ya se ha mencionado anteriormente, los ratones inmunizados con la nueva secuencia (SIPWSLERIT-KLH/alúmina) se utilizaron como grupo de puente entre los experimentos. De hecho, el grupo puente en el que se inyectó la nueva secuencia (SIPWSLERIT-KLH/alúmina) se comportaba de manera similar en ambos experimentos (figuras 5a, 5b, 6a y 6b) y, más importante, la totalidad de los tres grupos inmunizados con vacunas que contenían una de las secuencias SIPWSLERIT, VIPWNLERIL o SVPWNLERIQ se comportaba de una manera muy similar en términos de reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total (figuras 6a y 6b).

De esta manera, los presentes datos confirman la eficiencia significativa de las vacunas según la presente invención, es decir, las vacunas de péptido que contenían las secuencias SEC ID n° 21 SIPWSLERIT, SEC ID n° 55 VIPWNLERIL y SEC ID n° 60 SVPWNLERIQ, de inducción de anticuerpos funcionales que son capaces no sólo de reducir fuertemente los niveles de TC plasmático en comparación con el control negativo irrelevante, sino también de reducir significativamente los niveles de colesterol total en comparación con una vacuna que contiene la secuencia de PCSK9 original (SIPWNLERIT-KLH/alúmina).

La figura 5a muestra los valores medios plasmáticos, en mg/dl, tras la inmunización con vacuna que contiene la nueva secuencia SIPWSLERIT, en comparación con la inmunización con vacuna que contiene la secuencia de PCSK9 original, SIPWNLERIT, y con el grupo de control (negativo) irrelevante (SEC ID n° 2, ERTKSDPGAQHREF). La reducción altamente significativa de los niveles de TC en el grupo inmunizado con la vacuna que contenía la nueva secuencia SIPWSLERIT, en comparación con, por un lado, la vacuna que contenía la secuencia de PCSK9 original, SIPWNLERIT, y por otro lado, con el grupo de control negativo, resulta evidente a partir de esta figura. La figura 5b proporciona el % de reducción del TC de los grupos, en comparación con el grupo de control (negativo) irrelevante. Es necesario prestar especial atención a la reducción de ~20% del TC tras la vacunación con la secuencia de PCSK9 original (SIPWNLERIT-KLH/alúmina), en comparación con el control negativo irrelevante y la muy fuerte reducción, de hasta 35-40% de los niveles de TC tras la vacunación con la nueva secuencia (SIPWSLERIT-KLH/alúmina).

La figura 6a muestra los valores medios plasmáticos, en mg/dl, tras la inmunización con vacunas que contenían las nuevas secuencias SIPWSLERIT, VIPWNLERIL y SVPWNLERIQ, en comparación con el grupo de control (negativo) irrelevante (SEC ID n° 2, ERTKSDPGAQHREF). La reducción altamente significativa de los niveles de TC en la totalidad de los tres grupos inmunizados con las nuevas secuencias en comparación con el grupo de control negativo, resulta evidente a partir de esta figura. La figura 6b proporciona el % de reducción del TC de los grupos en los que se ha inyectado SIPWSLERIT, VIPWNLERIL y SVPWNLERIQ, en comparación con el grupo de control (negativo) irrelevante. Debe prestarse atención especial a la reducción significativamente fuerte, hasta de 40%, del TC tras la vacunación con la totalidad de las tres nuevas secuencias, SIPWSLERIT, VIPWNLERIL y SVPWNLERIQ. De hecho, el grupo inmunizado con la vacuna que contenía la nueva secuencia SIPWSLERIT (grupo puente entre experimentos) se comportó de manera similar en ambos experimentos (ver las figuras 5a y 5b), confirmando la funcionalidad significativamente más alta de los anticuerpos generados tras las inmunizaciones con vacunas que contenían las nuevas secuencias SIPWSLERIT, VIPWNLERIL y SVPWNLERIQ, en comparación con vacunas que contenían la secuencia de PCSK9 original, SIPWNLERIT.

A partir de dichos datos, resulta evidente que las vacunas según la presente invención, es decir, las vacunas de péptido que comprenden las secuencias SEC ID n° 21, SIPWSLERIT, SEC ID n° 55, VIPWNLERIL y SEC ID n° 60, SVPWNLERIQ, muestran un efecto ventajoso inesperado y sorprendente, en comparación con las vacunas presentadas en la técnica anterior.

50 **Listado de secuencias**

<110> Affiris AG

<120> Vacuna

<130> R 64465

<150> EP 12182241.5

<151> 29.08.2012

<160> 118

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

- <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos sin carga, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en serina, treonina, valina y alanina
- <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos sin carga, preferentemente seleccionados de entre el grupo de isoleucina, valina, glicina, glutamina y alanina, más preferentemente isoleucina, valina, glutamina y alanina
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 25 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos sin carga, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en prolina, treonina, alanina y valina, más preferentemente prolina
- <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en asparagina, serina, alanina, glutamina y ácido aspártico
- <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en leucina, glicina, alanina, tirosina, ácido aspártico, fenilalanina y valina, preferentemente leucina
- 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 45 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos negativamente cargados hidrófilos, residuos aminoácidos negativamente cargados, preferentemente un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 50 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos sin carga, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en isoleucina, leucina, alanina y treonina
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo de residuos aminoácidos sin carga, preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en treonina, leucina, glutamina, alanina y serina o ninguno
- 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es X10X11X12 tal como se define en la solicitud de patente presentada o un fragmento truncado C-terminal del mismo que consiste en 1 o 2 residuos aminoácidos o ninguno
- 65 <400> 1

Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 2
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de PCSK9

10 <400> 2
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

15 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 3
Glu Arg Thr Lys Ser Asp Pro Gly Ala Gln His Arg Glu Phe
 1 5 10

25 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 4
Ile Thr Glu Leu Ser Arg Trp Pro Asn Ile
 1 5 10

35 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 5
Thr Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 45 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

55 <400> 6
Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

5 <400> 7
 Ala Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

15 <400> 8
 Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

<210> 9
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 9
 Ser Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

30 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 10
 Ser Ala Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

40 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 11
 Ser Gly Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 50 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

60 <400> 12

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

<210> 13
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

10 <400> 13
Ser Ile Ala Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

15 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 14
Ser Ile Val Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

25 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 15
Ser Ile Pro Phe Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

35 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 16
Ser Ile Pro Ala Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

45 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

55 <400> 17
Ser Ile Pro Gly Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

60 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

5

<400> 18

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

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 19

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

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

25 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 20

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

30

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 21

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

40

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 22

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

50

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

60

<400> 23

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

<210> 35
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

10 <400> 35
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Asp Ile Thr
 1 5 10

15 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 36
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr
 1 5 10

25 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 37
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Thr Thr
 1 5 10

35 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 38
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ala Thr
 45 1 5 10

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

55 <400> 39
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Leu
 1 5 10

<210> 40
 <211> 10
 60 <212> PRT

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

<210> 46
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

10 <400> 46
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Val Arg
 1 5 10

15 <210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 47
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Thr Arg
 1 5 10

25 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 48
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Asn Arg
 1 5 10

35 <210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 49
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Ala
 45 1 5 10

<210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

55 <400> 50
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Lys
 1 5 10

<210> 51
 <211> 13
 60 <212> PRT


```

Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Gln
1           5           10

<210> 57
<211> 10
5 <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia artificial, Mimotopo
10

<400> 57
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr
1           5           10

<210> 58
15 <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 58
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Thr Thr
1           5           10

25 <210> 59
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 59
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Leu
35 1           5           10

<210> 60
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial
40

<220>
<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 60
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Gln
45 1           5           10

<210> 61
   <211> 10
   <212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia artificial, Mimotopo

55 <400> 61
Ser Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr
1           5           10

<210> 62
   <211> 10
60 <212> PRT

```

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

5

<400> 62

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

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 63

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

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

25 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 64

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

30

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 65

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

40

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

50

<400> 66

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

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

60

<400> 67

Ser Ile Pro Trp Ser Leu Glu Arg Ile Gln
 1 5 10

<210> 68
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

10 <400> 68
Val Gln Pro Trp Ser Leu Glu Arg Thr Leu
 1 5 10

15 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 69
Ser Gln Pro Trp Ser Leu Glu Arg Thr Leu
 1 5 10

25 <210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 70
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Lys Leu Thr
 1 5 10

35 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 71
Val Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Gln
 1 5 10

45 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

55 <400> 72
Val Gln Pro Trp Ser Leu Glu Arg Leu Leu
 1 5 10

60 <210> 73
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

5

<400> 73
Ser Val Pro Trp Ser Leu Glu Arg Leu Thr
 1 5 10

<210> 74
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

15

<400> 74
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala
 1 5 10 15

Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val
 20 25 30

20

<210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 75
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr
 1 5 10

30

<210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 76
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile
 1 5

40

<210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 77
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro
 1 5 10

50

<210> 78
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 78
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro
 1 5 10

5 <210> 79
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 79
Thr Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

15 <210> 80
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

25 <400> 80
Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

30 <210> 81
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 81
Ala Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

40 <210> 82
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 82
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

50 <210> 83
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 83
Ser Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

60

<210> 84
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 <400> 84
Ser Ala Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 10 1 5 10

 <210> 85
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 20 <400> 85
Ser Ile Thr Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

 <210> 86
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 30
 <400> 86
Ser Ile Ala Trp Asn Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

 <210> 87
 35 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 <400> 87
Ser Ile Pro Trp Ser Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

 45 <210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 <400> 88
Ser Ile Pro Trp Ala Leu Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 55 1 5 10

 <210> 89
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 89
Ser Ile Pro Trp Asn Ala Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

5

<210> 90
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 90
Ser Ile Pro Trp Asn Gly Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

15

<210> 91
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

25

<400> 91
Ser Ile Pro Trp Asn Tyr Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

<210> 92
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

35

<400> 92
Ser Ile Pro Trp Asn Asp Glu Arg Ile Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

<210> 93
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

45

<400> 93
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

50

<210> 94
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 94
Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Thr Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

60

<210> 95
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 <400> 95
 Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ala Thr Pro Pro Arg
 10 1 5 10
 <210> 96
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 20 <400> 96
 Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Leu Pro Pro Arg
 1 5 10
 <210> 97
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 30 <400> 97
 Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Gln Pro Pro Arg
 1 5 10
 <210> 98
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 <400> 98
 Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Ala Pro Pro Arg
 1 5 10
 45 <210> 99
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 <400> 99
 Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr Pro Pro Arg
 55 1 5 10
 <210> 100
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 100
Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Thr Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

5

<210> 101
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 101
Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Leu Pro Pro Arg
 1 5 10

15

<210> 102
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

25

<400> 102
Val Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Gln Pro Pro Arg
 1 5 10

30

<210> 103
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 103
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

40

<210> 104
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 104
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Thr Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

50

<210> 105
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 105
Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Leu Pro Pro Arg
 1 5 10

60

<210> 106
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 <400> 106
 Ser Val Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Gln Pro Pro Arg
 10 1 5 10
 <210> 107
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 20 <400> 107
 Ser Ile Pro Trp Ser Leu Glu Arg Thr Thr Pro Pro Arg
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 30 <400> 108
 Ser Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Thr Pro Pro Arg
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 <400> 109
 Ser Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Leu Pro Pro Arg
 1 5 10
 45 <210> 110
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 <400> 110
 Ser Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Ile Gln Pro Pro Arg
 1 5 10
 55 <210> 111
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

<223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 111
Ser Ile Pro Trp Ser Leu Glu Arg Leu Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

5 <210> 112
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 112
Ser Ile Pro Trp Ser Leu Glu Arg Ile Leu Pro Pro Arg
 1 5 10

15 <210> 113
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

25 <400> 113
Ser Ile Pro Trp Ser Leu Glu Arg Ile Gln Pro Pro Arg
 1 5 10

30 <210> 114
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 114
Val Gln Pro Trp Ser Leu Glu Arg Thr Leu Pro Pro Arg
 1 5 10

40 <210> 115
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 115
Ser Gln Pro Trp Ser Leu Glu Arg Thr Leu Pro Pro Arg
 1 5 10

50 <210> 116
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 116
Val Gln Pro Trp Asn Leu Glu Arg Leu Gln Pro Pro Arg
 1 5 10

60

<210> 117
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 <400> 117
 Val Gln Pro Trp Ser Leu Glu Arg Leu Leu Pro Pro Arg
 10 1 5 10

 <210> 118
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 20 <400> 118
 Ser Val Pro Trp Ser Leu Glu Arg Leu Thr Pro Pro Arg
 1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende por lo menos un péptido seleccionado de entre el grupo SIPWSLERIT (SEC ID nº 21), VIPWNLERIL (SEC ID nº 55) y SVPWNLERIQ (SEC ID nº 60), en la que dicho por lo menos un péptido se acopla o fusiona con un portador farmacéuticamente aceptable.
2. Vacuna según la reivindicación 1, en la que por lo menos un péptido comprende en su extremo N y/o C por lo menos un residuo de cisteína unido directamente o mediante una secuencia espaciadora unida al mismo.
- 10 3. Vacuna según la reivindicación 1 o 2, en la que el portador farmacéuticamente aceptable es un portador proteínico.
- 15 4. Vacuna según la reivindicación 3, en la que el portador proteínico se selecciona de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa americana (KLH), toxoide tetánico (TT), proteína D o toxina diftérica (TD), preferentemente una toxina diftérica mutada, más preferentemente CRM197.
- 20 5. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la vacuna se formula con un adyuvante, preferentemente adsorbida a Alhydrogel.
- 25 6. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la utilización en un método para tratar y/o prevenir los trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular o enfermedades vasculares periféricas.
- 30 7. Vacuna que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo SIPWSLERIT (SEC ID nº 21), VIPWNLERIL (SEC ID nº 55) y SVPWNLERIQ (SEC ID nº 60).
- 35 8. Vacuna para la utilización según la reivindicación 6, en la que los péptidos se administran a un mamífero o individuo en una cantidad de 0,1 ng a 10 mg, preferentemente de 0,5 a 500 µg, más preferentemente 1 a 100 µg por inmunización.
9. Vacuna para la utilización según la reivindicación 6 o 8, en la que la vacuna se aplica entre 2 y 10, preferentemente entre 2 y 7, todavía más preferentemente hasta 5 y de la manera más preferida hasta 4 veces.
10. Vacuna para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 o 9, en la que la vacuna contiene los péptidos en una cantidad de 0,5 a 500 µg, preferentemente 1 a 100 µg o, alternativamente de 100 fmoles a 10 µmoles, preferentemente 10 pmoles a 1 µmol, especialmente 100 pmoles a 100 nmoles.

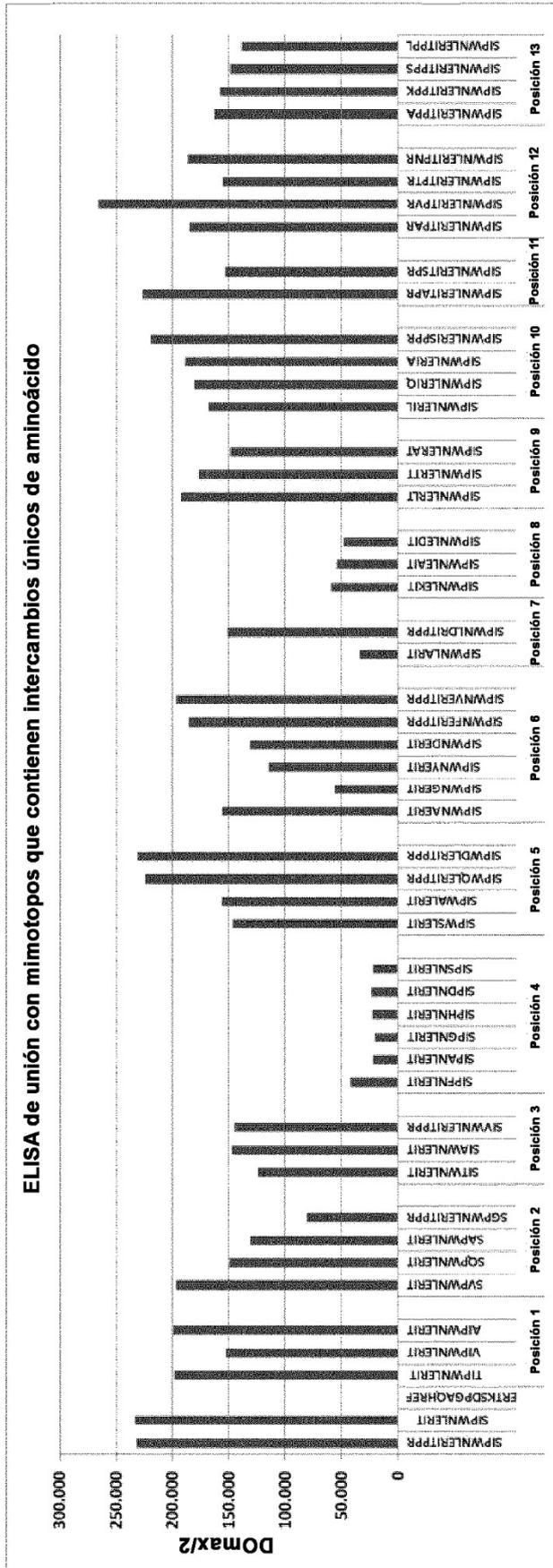


Figura 1A

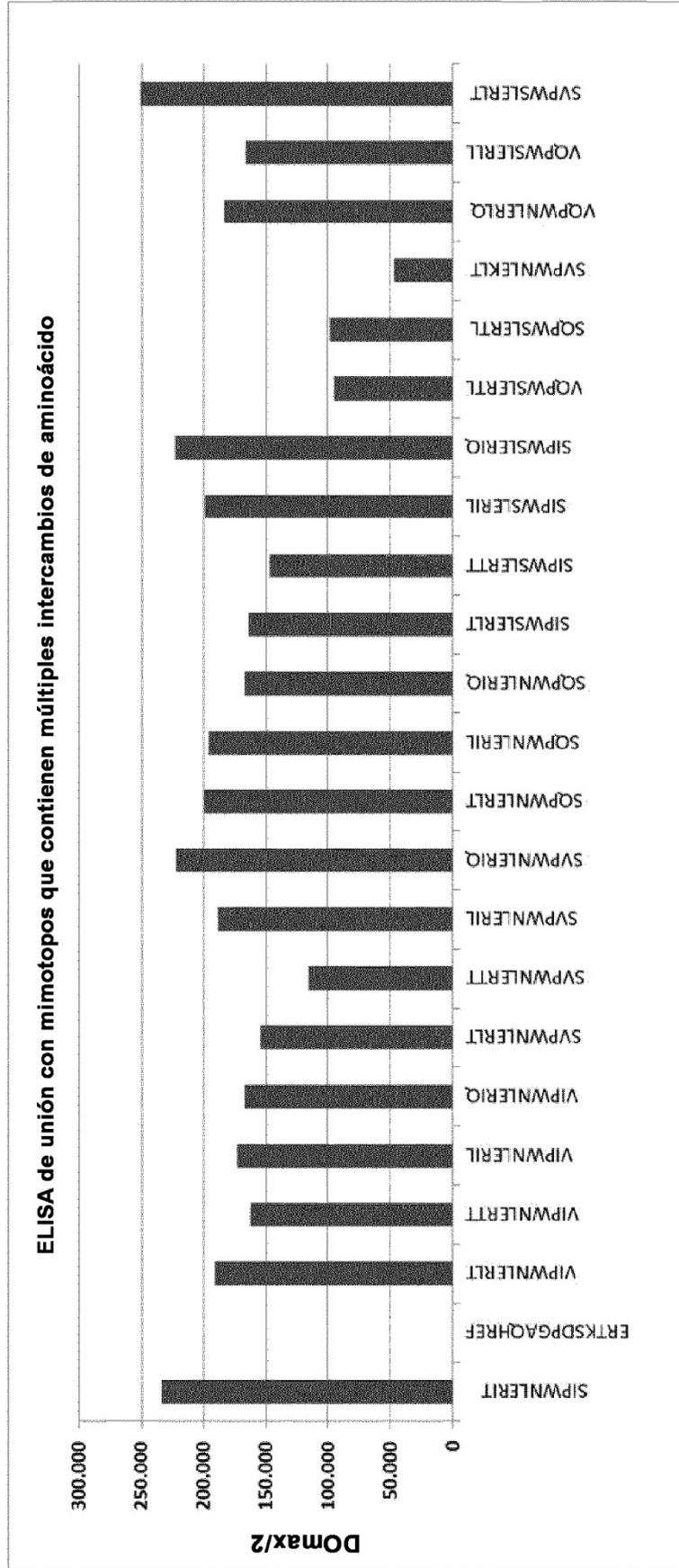


Figura 1B

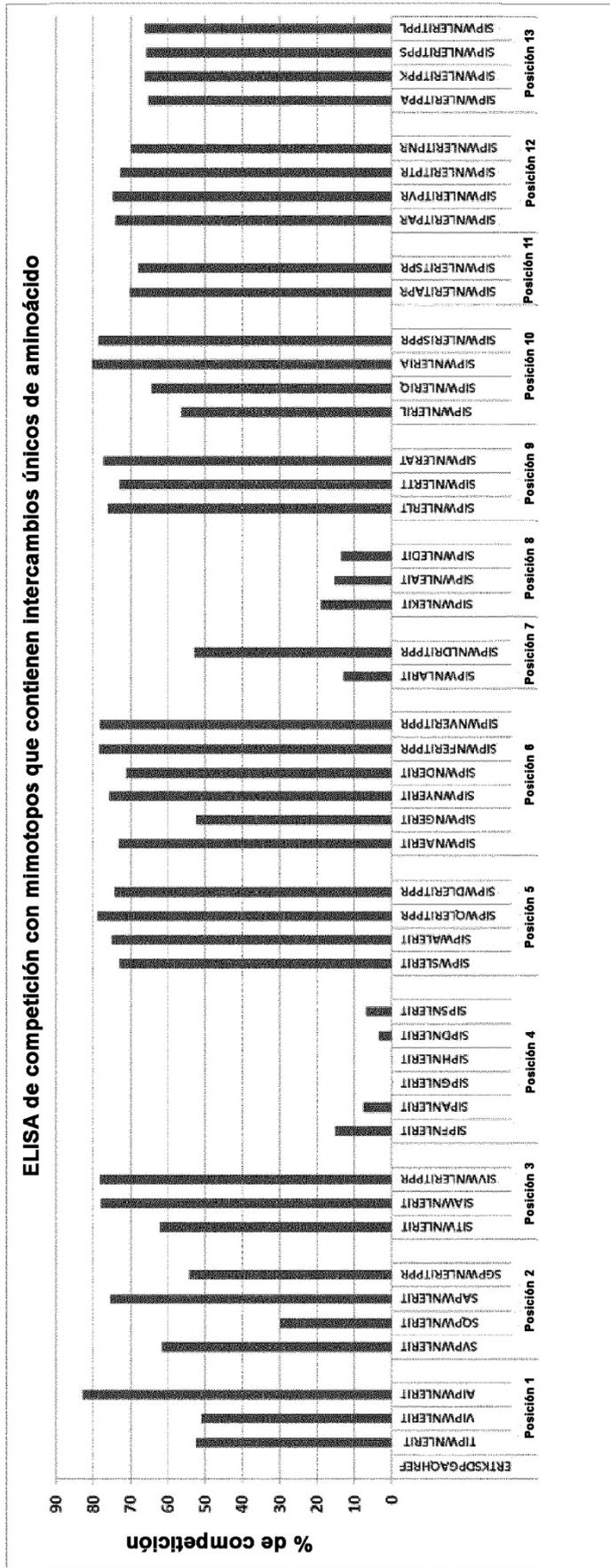


Figura 2A

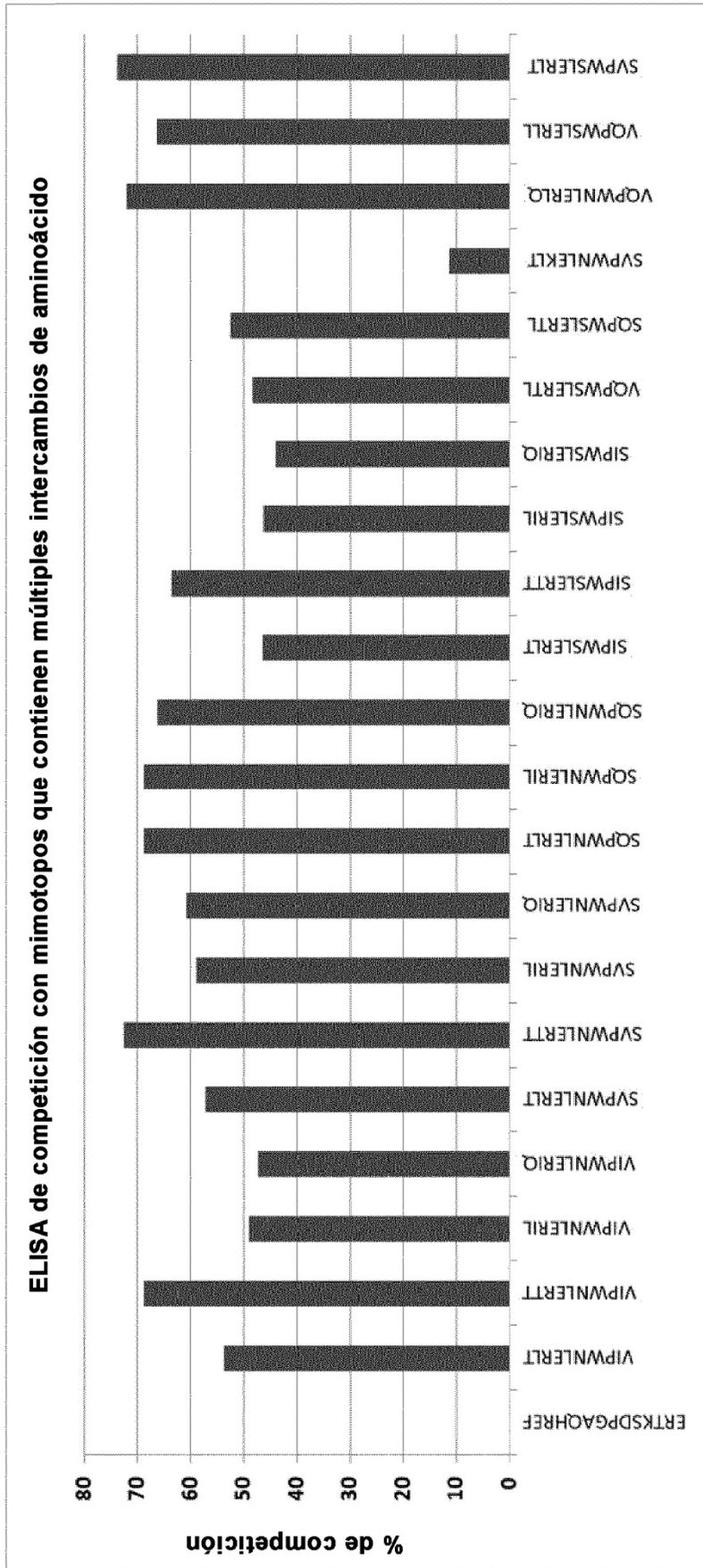


Figura 2B

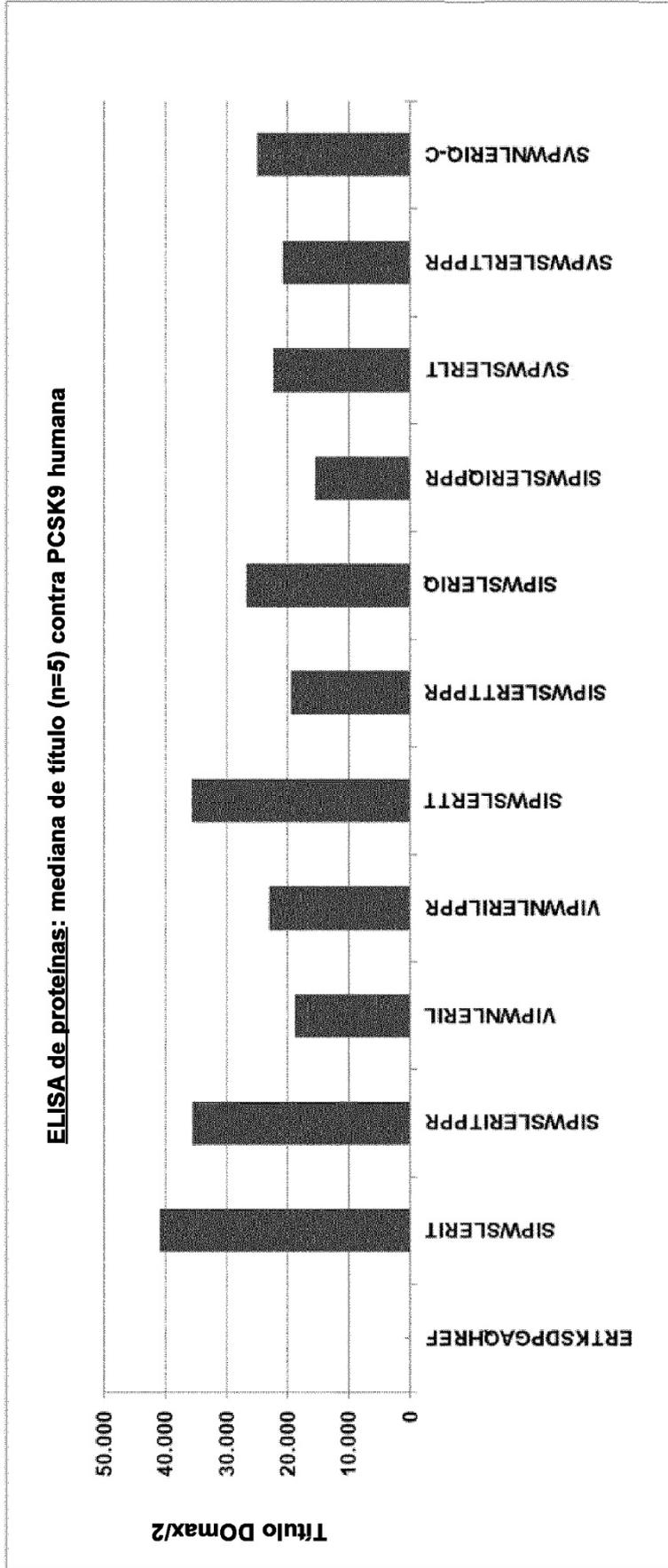


Fig. 3

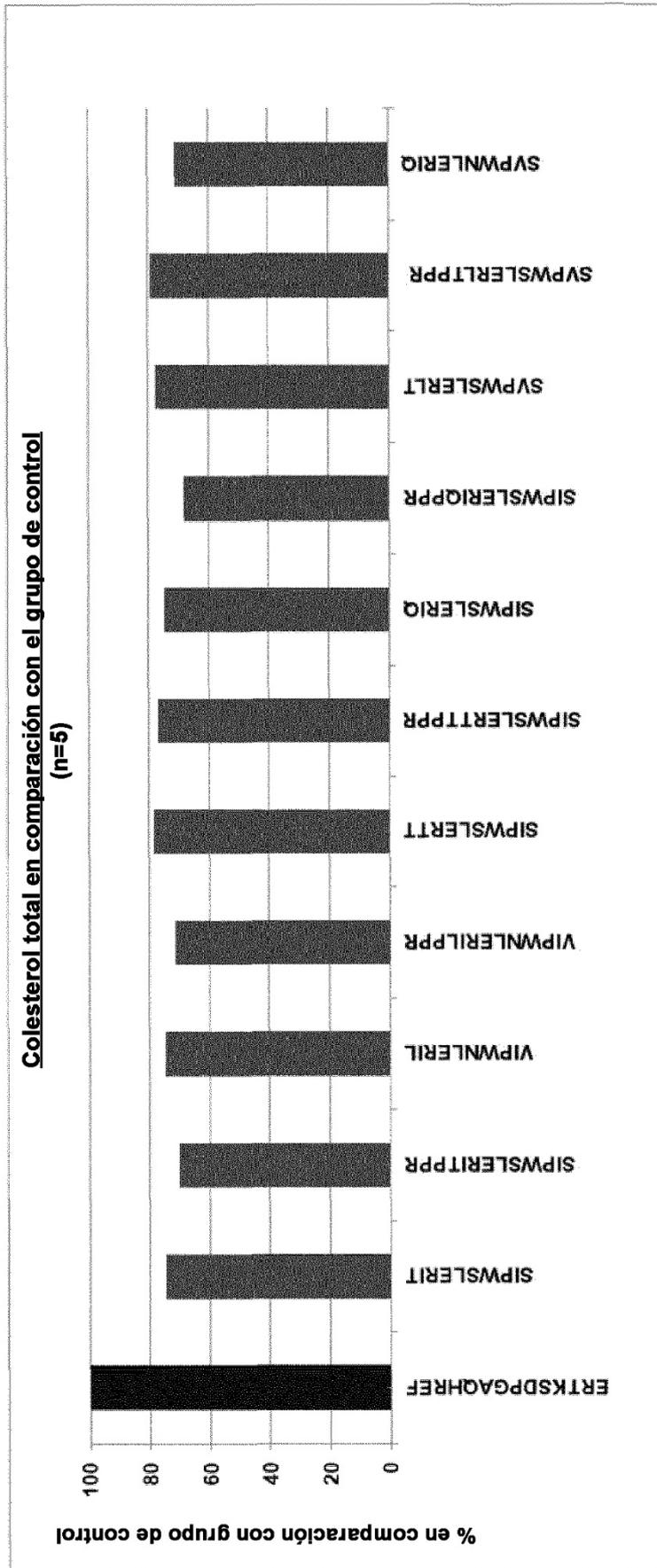


Fig. 4

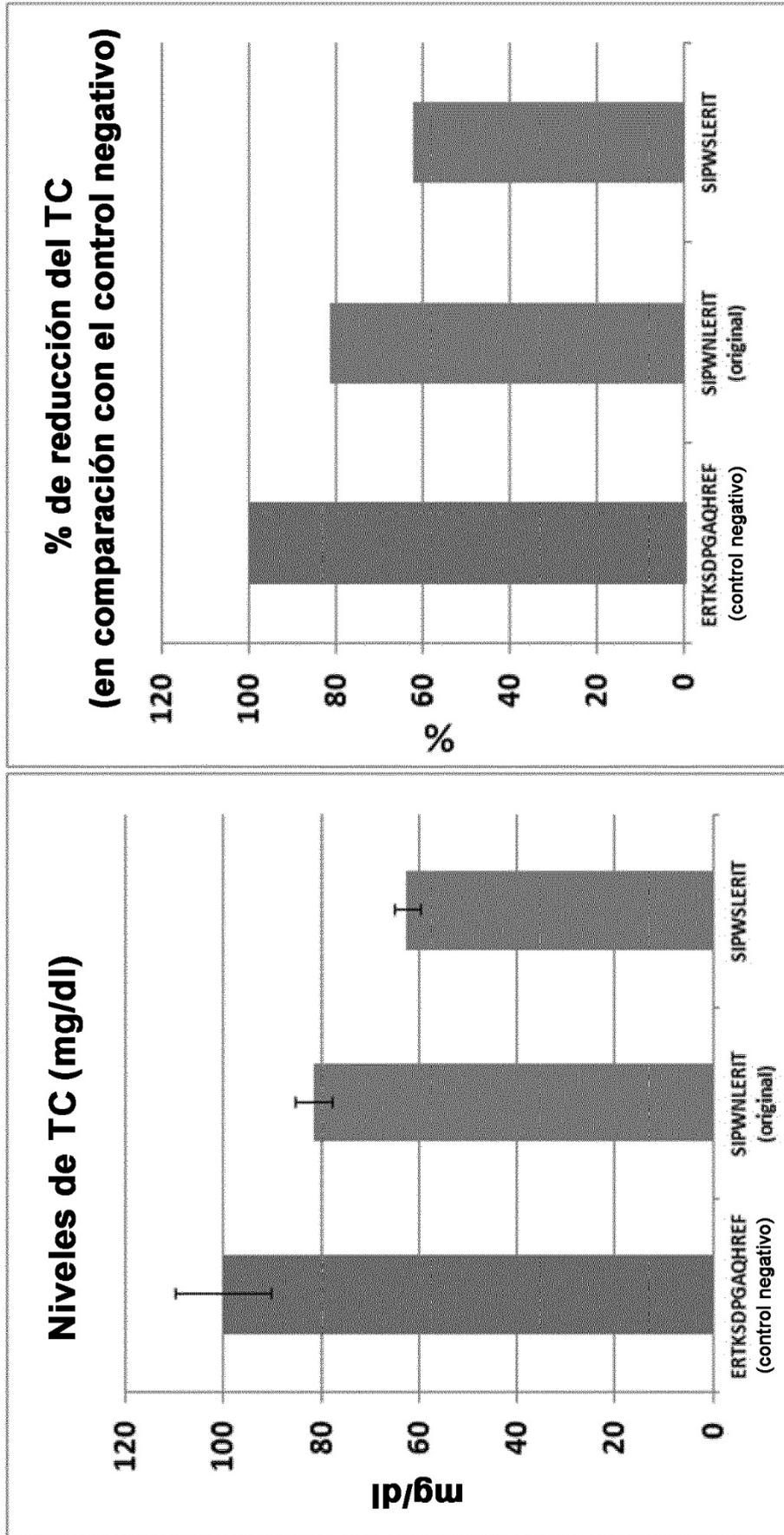


Fig. 5b

Fig.5a

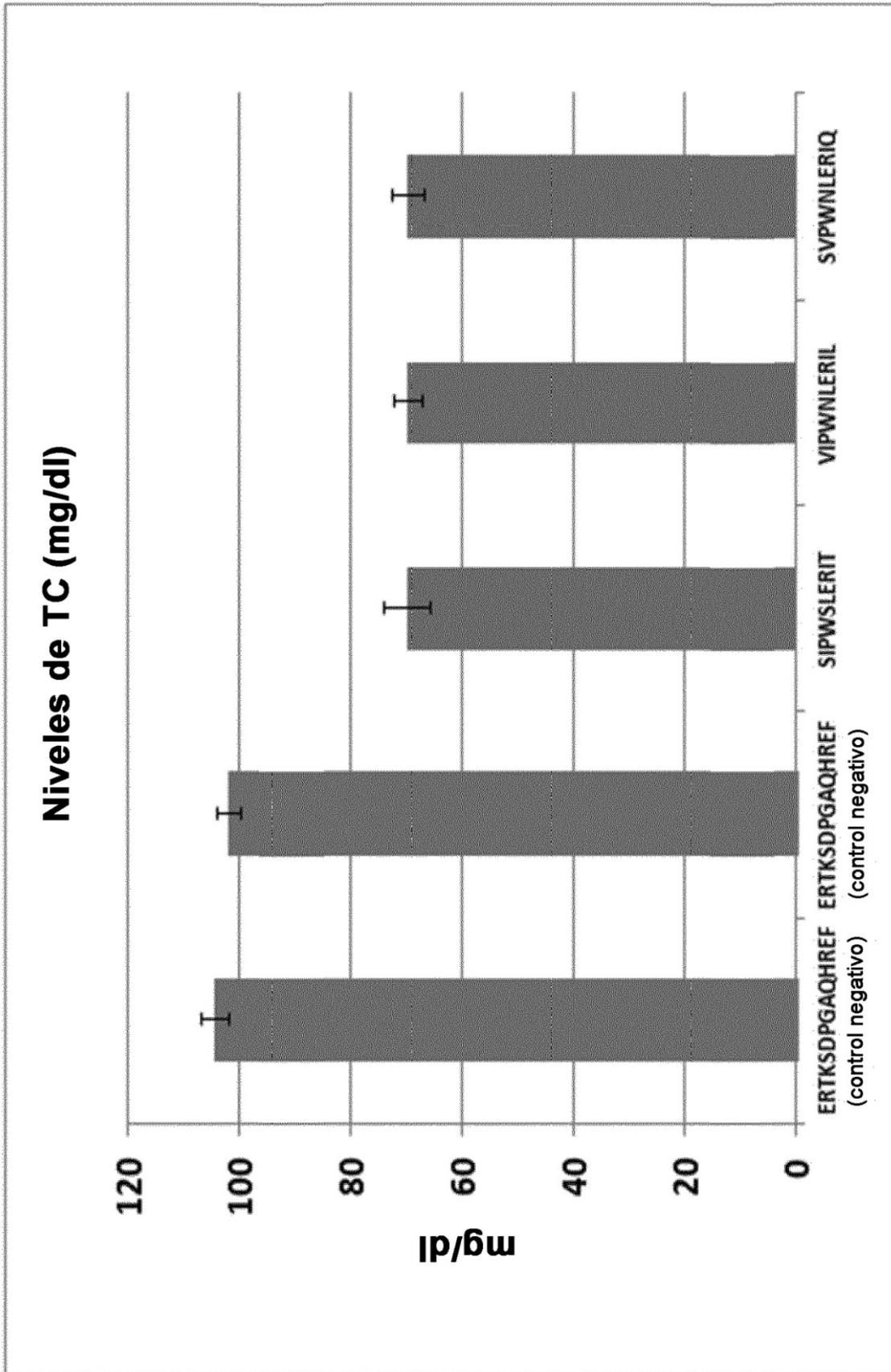


Fig.6a

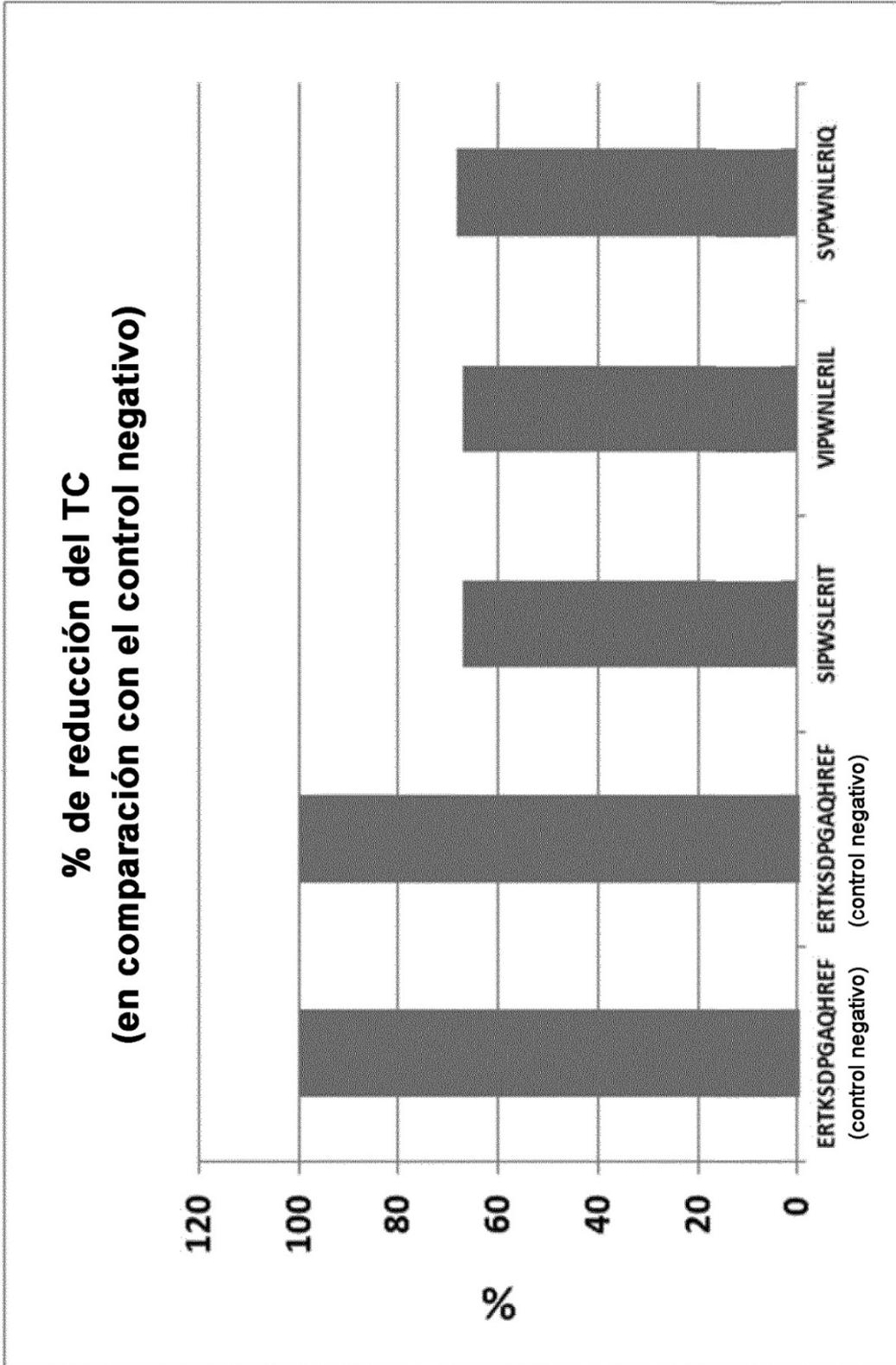


Fig.6b