

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 741**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2015 PCT/EP2015/053725**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2015 E 15714770 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3110439**

54 Título: **Vacunas de PCSK9**

30 Prioridad:

28.02.2014 EP 14157221

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

25.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GALABOVA, GERGANA;
STAFFLER, GÜNTHER;
BRUNNER, SYLVIA;
WINSAUER, GABRIELE;
MAIRHOFER, ANDREAS y
JUNO, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 732 741 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

Vacunas de PCSK9.

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunógenos aptos para inducir la formación de anticuerpos dirigidos contra la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9).

10 Los trastornos vasculares, tales como la hipercolesterolemia, la aterosclerosis, la cardiopatía coronaria y el accidente cerebrovascular, son una de las principales causas de muerte en el mundo, y los niveles elevados de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDLc) están jugando un papel clave en su patogénesis. De este modo, el manejo de LDLc es un elemento muy importante para un tratamiento exitoso de la dislipidemia y aterosclerosis.

15 El descubrimiento de PCSK9 en 2003, y su identificación como el tercer factor, entre LDLR y ApoB-100, que participa en el desarrollo de la hipercolesterolemia dominante autosómica (ADH), aporta un nuevo conocimiento al mecanismo del desarrollo de la enfermedad de ADH. Además, estudios de genética en seres humanos confirmaron la conexión entre los niveles de LDLc, PCSK9 y la aparición de la cardiopatía coronaria. El vínculo entre PCSK9 y LDLc elevado asimismo se ha observado en diferentes modelos de animales.

20 La PCSK9 se expresa principalmente en el hígado, el intestino y el riñón, y asimismo se encuentra segregado en el torrente sanguíneo. Interactúa directamente con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) (LDLR), y el complejo formado es internalizado posteriormente. Mediante la unión a LDLR, PCSK9 promueve la degradación del receptor, y da como resultado la elevación de LDLc en plasma. La "ganancia de mutaciones de función" (GOF) en el gen de PCSK9 mejora su interacción con el LDLR, lo que conduce a niveles de LDLc notablemente más
25 altos, hipercolesterolemia posterior, y predisposición a la aterosclerosis. Mientras tanto, las mutaciones de "pérdida de mutaciones de función" (LOF) de PCSK9 están vinculadas a un menor riesgo de cardiopatía coronaria (CHD). De manera interesante, dos casos de mujeres sanas que tienen pérdida de PCSK9 funcional y LDLc muy bajo (~ 14 mg/dL) resaltaron a PCSK9 como no esencial, y como diana prometedoras para reducir los niveles de LDLc en el torrente sanguíneo.

30 La sobreexpresión de PCSK9 en ratones de tipo salvaje reduce significativamente la proteína LDLR hepática, a pesar de los niveles de mRNA estables, lo que lleva a un aumento de LDLc circulante. En comparación, la sobreexpresión de PCSK9 en ratones LDLR -/- no influye en los niveles de LDLc, lo que confirma la dependencia de PCSK9 de LDLR para jugar un papel en el catabolismo de LDL. Y como se esperaba, ratones PCSK9-/- mostraron un aumento de 2.8 veces en los niveles de LDLR, y reducción de LDLc, en comparación con animales de tipo salvaje. Finalmente, la secreción de PCSK9 en la circulación fue anulada, durante la inactivación de PCSK9 en el tejido hepático, lo que confirma al hígado como el órgano principal responsable de la secreción de PCSK9.

40 De este modo, PCSK9 juega un papel crucial en el catabolismo de LDL, a pesar de las acciones directas sobre LDLR. La inhibición de PCSK9 parece ser beneficiosa para los niveles de LDLc. Por lo tanto, las terapias anti-PCSK9 son enfoques prometedores en términos de modulación beneficiosa de los niveles de LDLc.

45 La PCSK9, asimismo conocida como convertasa 1 regulada por apoptosis neural (NARC-1), es una subtilasa similar a proteinasa K segregada, y miembro de la familia de proproteína convertasas (PC) de mamíferos. Se sintetiza como una proproteína de ~72 kDa, y a fin de ser funcional, el precursor (pro-PCSK9) es procesado para autocatálisis. Esto da como resultado la formación de un producto (aa31-152) que se une fuertemente de forma no covalente en la formación de complejos 1:1 con el fragmento de PCSK9 (aa153-692) en esta forma madura (~60-63kDa) PCSK9 es procesada hacia la trayectoria secretora.

50 Adicionalmente a esta forma de PCSK9 madura, se ha observado otra forma truncada (escindida por furina) de PCSK9 en muchas líneas celulares y plasma sanguíneo. El plasma humano y de ratón contiene las dos formas de PCSK9, madura (aa153-692) y su versión truncada (aa218-692), y en plasma de ratón la forma truncada puede representar hasta ~ 50% de la PCSK9 plasmática total. Esta PCSK9 truncada escindida por furina es un producto de la escisión de PCSK9 madura (aa153-692) en el sitio de aa218-219, denominado por lo tanto como sitio de escisión de furina/PC5/6A. Durante tal escisión, se forma un fragmento truncado de PCSK9 subsiguiente (aa219-692) (denominado PCSK9 escindida por furina).

60 Los datos recientes confirmaron la capacidad de ambas formas, PCSK9 madura (aa153-692) y PCSK9 escindida por furina (aa219-aa692), para unirse al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), y de este modo regular su nivel y por lo tanto los niveles de LDLc.

65 En el proceso de unión a LDLR, el dominio catalítico de PCSK9 interactúa con LDLR a través de diferentes sitios. Como resultado de esta unión, PCSK9 se está posicionando a sí misma con el dominio de EGF (B) de LDLR en una conformación estructural que refuerza y optimiza nuevamente esta interacción a través de un segundo sitio conocido como región en la que está posicionado el sitio de escisión de furina/PC5/6A (aa218-219).

De este modo, los agentes terapéuticos dirigidos contra el sitio de PCSK9 de escisión por furina/PC5/6A (aa218-219) entre su capacidad para anular el correcto posicionamiento de PCSK9 con respecto a LDLR serían capaces de bloquear la acción de la furina sobre PCSK9. Tales agentes terapéuticos anularán en paralelo la interacción PCSK9/LDLR indirecta (posicionamiento), e inhibirán la producción de una forma activa truncada de PCSK9 que se une a LDLR (aa219-692). Esto llevaría a un aumento beneficioso de LDLR, y por lo tanto a la reducción beneficiosa de LDLc en plasma.

Los ensayos clínicos a lo largo de los últimos 25 años confirmaron el claro beneficio en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y la reducción de los niveles circulantes de LDLc mediante el uso de inhibidores de 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (estatinas). Las estatinas actúan mediante la inhibición de la biosíntesis del colesterol hepático que conduce a aumento subsiguiente de la proteína de unión del elemento regulador de esterol (en adelante denominada SREBP). La SREBP es un regulador de genes implicados en la homeostasis de los lípidos, tales como LDLR. Y la SREBP elevada conduce a aumentar los niveles de proteína LDLR, y a aumentar subsiguientemente la absorción posterior de LDLc de la circulación.

Las estatinas son la terapia más común utilizada contra la dislipidemia. Pero a pesar de su eficacia, el tratamiento con estatinas está ligado muy a menudo a efectos adversos, tales como enzimas hepáticas elevadas, dolor muscular y miositis. Además, el número significativo de pacientes tratados con estatinas no logra alcanzar sus objetivos en términos de manejo beneficioso de LDLc, y algunos de ellos son incluso intolerantes a las estatinas. De forma interesante, actuar sobre las estatinas SREBP no sólo aumenta el LDLR, sino asimismo eleva la expresión de PCSK9, lo que conduce a contrarrestar el efecto farmacológico.

De este modo, una combinación de estatinas junto con una terapia anti-PCSK9 se consideró como enfoque prometedor para el manejo de LDLc con potencia del efecto sinérgico/aditivo en comparación con el tratamiento individual.

Y considerablemente las terapias anti-PCSK9 se convirtieron en un modulador de LDLc futuro potencial aún más atractivo. Eso es apropiado no solamente como una monoterapia, sino asimismo como una nueva terapia adyuvante para las terapias actuales más recomendadas y usadas, tales como las estatinas u otras sustancias, tales como fibratos o ácido nicotínico. Mientras tanto, se han establecido varias estrategias diferentes para suprimir la síntesis o la función de PCSK9. Durante la última década, se han desarrollado bastante activamente enfoques para la inhibición de la síntesis mediante silenciamiento de genes con oligonucleótidos antisentido (ASO), oligonucleótidos antisentido de ácidos nucleicos bloqueados (LNO-ASO), y ARNpi. Además, se ha aplicado con éxito la tecnología de ASO para la inhibición de la apolipoproteína-B, y se ha aprobado recientemente por la Food and Drug Administration (FDA). De hecho, la aplicación de ARNpi contra PCSK9 en monos (*Macaca fascicularis*) condujo a una reducción significativa del colesterol total. En general, el resultado de los diferentes métodos para el silenciamiento de genes de PCSK9 es controvertido, y aparentemente depende de la especificidad del enfoque. Dos fases clínicas I que utilizan ARNpi y oligonucleótido LNA se enfrentan a algunos retos, y eran de terminación prematura por razones inciertas. Sin embargo, por otro lado, una tercera fase I de ensayos clínicos con la inhibición de PCSK9 mediante ARNpi terminó con éxito.

Se han diseñado otros enfoques terapéuticos prometedores para la inhibición de la interacción PCSK9-LDLR mediante péptidos miméticos y adnectinas. Pero a pesar de las diferentes posibilidades para la inhibición, uno de los enfoques más avanzados para la reducción de LDLc mediante la modulación de PCSK9 son anticuerpos monoclonales anti-PCSK9. Hasta la fecha, muchos estudios clínicos que evaluaron los anticuerpos monoclonales anti-PCSK9 están actualmente en curso. En ensayos clínicos de fase I con sujetos sanos, una única dosis de anticuerpo monoclonal anti-PCSK9, introducida por vía intravenosa o subcutánea, fue capaz de reducir los niveles de LDLc hasta 67%. Además, el mismo mAb, aplicado por vía subcutánea dos veces por semana, o en un intervalo de 4 semanas en sujetos en tratamiento con estatinas, logró una reducción de LDLc hasta 81%. Además, un ensayo clínico de fase II con el mismo anticuerpo monoclonal (tratamiento dos veces por semana) en pacientes intolerantes a estatinas redujo el LDLc en el intervalo de 41-66%. Esos estudios confirmaron que la terapia anti-PCSK9 es eficiente no sólo en sujetos sanos sino asimismo en población intolerante a estatinas y tratados con estatinas. Además, sobre la base de los resultados positivos de los ensayos clínicos finalizados de fase III, se realizaron ensayos clínicos para evaluar el efecto de la terapia con mAb anti-PCSK9 en pacientes con antecedentes de infarto de miocardio previo o accidente cerebrovascular, factores de riesgo coronario y síndrome coronario, y se informó recientemente que cumplen criterios de valoración coprincipales. Sin embargo, un aspecto importante de las terapias de anticuerpos monoclonales anti-PCSK9 es la falta de un manejo de LDLc persistente a largo plazo.

Los documentos WO 2009/055783 A2, WO 2009/100297 A1, WO 2010/057242 A2, WO 2011/02757 A2, WO 2011/117401 A1, WO 2012/59573 A1, WO 2013/037889 A2 y WO 2013/148284 A1 describen vacunas con péptidos PCSK9 antigénicos. Luo *et al.* (J. Lipid Res 50 (2009): 1581-1588) describen la función y distribución de PCSK9 humana circulante expresada extrahepáticamente en ratones transgénicos.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos para reducir LDLc en un individuo; es un objetivo específico de la presente invención proporcionar nuevos péptidos PCSK9 antigénicos como vacunas con

potencial antigénico mejorado y que sean eficientes para la reducción de colesterol en individuos vacunados. La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

5 La presente invención se refiere a variantes inmunopotenciadoras específicas (intercambios de aminoácidos y truncamientos opcionales) del fragmento de PCSK9 que consiste en los restos de aminoácidos 209 a 222 de SEC ID nº 1.

10 Los péptidos de la presente invención son los denominados VARIOTOPE®, es decir, variaciones de aminoácidos de la secuencia nativa original del péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1). Los VARIOTOPE® tienen una secuencia de aminoácidos que es diferente de la secuencia de la proteína/péptido original de la que derivan. Los VARIOTOPE® de acuerdo con la presente invención son considerados como extraños por el sistema inmunitario, y de este modo no es necesario romper la autotolerancia.

15 La presente invención se refiere a una vacuna, composición de vacuna o composición que comprende por lo menos un péptido que consiste en un péptido VARIOTOPE® o un fragmento peptídico del mismo, derivado del fragmento de PCSK9 que consiste en los restos de aminoácidos 209 a 222 (SEC ID nº 1), como se define en las reivindicaciones.

20 La presente descripción asimismo proporciona una vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en 9 a 25 restos de aminoácidos, siendo el péptido una variante del péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1) con una mayor inmunogenicidad en mamíferos, especialmente seres humanos, en comparación con PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), y en el que la variante se caracteriza por que presenta por lo menos un, y como máximo cuatro, intercambios de aminoácidos en comparación con PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1).

25 Los péptidos proporcionados con la presente invención son variantes inmunopotenciadoras de la secuencia de aminoácidos de PCSK9 nativa PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1). Los péptidos de acuerdo con la presente invención se han diseñado y seleccionado de forma diligente para proporcionar una respuesta inmunitaria mejorada frente a PCSK9 bajo consideración cuidadosa de problemas de autotolerancia habitualmente conectados con vacunas que dependen de las secuencias de PCSK9 nativas.

30 Los péptidos de acuerdo con la presente invención tienen variaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1). Es sorprendente que con tales pocos intercambios de aminoácidos se pudiesen proporcionar variaciones de péptidos inmunopotenciadoras, especialmente con respecto a su otra propiedad beneficiosa, a saber, que estos nuevos péptidos no tienen que romper la autotolerancia.

35 Los péptidos preferidos de acuerdo con la presente invención tienen una mayor inmunogenicidad, en comparación con el péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), de por lo menos 50%, preferentemente por lo menos 100%, especialmente por lo menos 200%, como se evidencia en un ELISA de suero, por ejemplo como se evidencia por el ejemplo a continuación.

40 De acuerdo con una forma de realización preferida, los péptidos en la vacuna de la presente invención tienen una mayor capacidad para reducir los niveles de colesterol total, en comparación con el péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), de por lo menos 3%, preferentemente por lo menos 5%, especialmente por lo menos 10%, como se evidencia en un ensayo de colesterol en suero (en cifras absolutas, siendo la comparación sin tratar el 100%), por ejemplo como se evidencia mediante el ejemplo a continuación. Para los péptidos de acuerdo con la presente invención, tales niveles reductores de colesterol total mejorados, en comparación con la secuencia nativa, se han confirmado experimentalmente en un modelo de colesterol científicamente aceptado. En consecuencia, la variante de acuerdo con la presente invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en PEEDGTRFHRRASK (SEC ID nº 17), PEEDGTRFHRKASK (SEC ID nº 18), y PEEDGTRFHRTASK (SEC ID nº 36). Aunque ya es sorprendente que un péptido variante de la secuencia nativa tenga una inmunogenicidad incrementada, en comparación con el péptido de la secuencia nativa PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), fue aún más sorprendente que tales péptidos asimismo pueden -en un modelo de colesterol científicamente aceptado- reducir el colesterol total más eficientemente que la secuencia nativa correspondiente.

55 Los péptidos contenidos en las vacunas de acuerdo con la presente invención están acoplados o fusionados a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente una proteína portadora, especialmente una proteína que comprende por lo menos un epítipo de linfocitos T.

60 La administración de una vacuna de acuerdo con la presente invención permite el tratamiento o la prevención de estados patológicos vinculados a PCSK9 y su papel en enfermedades tales como dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis.

65 Los péptidos de la presente invención son variantes (intercambios de aminoácidos, y truncamientos opcionales) del fragmento de PCSK9 que tiene la secuencia de aminoácidos PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1). Los péptidos de PCSK9 VARIOTOPE® de acuerdo con la presente invención se usan en una forma en la que los péptidos consisten en las secuencias dadas (opcionalmente con un enlazador unido a su extremo N- o C-terminal,

especialmente en su extremo C-terminal; siendo o conteniendo preferentemente dicho enlazador un resto de cisteína, especialmente un resto de cisteína en el extremo C-terminal).

5 La vacuna de la presente invención comprende por lo menos uno, por lo menos 2, o por lo menos 3, de los péptidos definidos en este documento, y permite la inmunización activa de un mamífero, en particular un individuo humano, en la que los anticuerpos neutralizantes para la PCSK9 son inducidos por vacunación con fragmentos derivados, especialmente cuando se combinan o fusionan a un péptido o polipéptido o una proteína portadora (tal como una molécula que comprende un epitopo de linfocitos T).

10 La combinación de péptido/portador es sobre todo importante puesto que los péptidos de la presente invención no tienen habitualmente la capacidad de inducir cantidades importantes de anticuerpos cuando se inyectan sin acoplamiento.

15 Así, la vacuna puede comprender una combinación de dos o más péptidos como se describe en la presente memoria. Sin embargo, asimismo es posible que la vacuna de la presente invención comprenda asimismo, próximos a uno o más péptidos enlazados a SEC ID nº 1, y como se define en la presente memoria, otros péptidos tales como mimotopos (es decir, mutantes de fragmentos de PCSK9; documento EP12182241) o fragmentos de PCSK9 (véase, por ejemplo, el documento WO 2013/037889).

20 Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse químicamente por métodos que son bien conocidos en la técnica. Por supuesto, asimismo es posible producir los péptidos de la presente invención usando métodos recombinantes. Los péptidos asimismo se pueden producir en microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos, en células eucariotas tales como células de mamífero o de insecto, o en un vector de virus recombinante tal como adenovirus, poxvirus, virus de herpes, virus del bosque de Simliki, baculovirus, bacteriófago, virus Sindbis o virus Sendai. Las bacterias adecuadas para la producción de los péptidos incluyen E. coli, B. subtilis, o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar tales péptidos. Células de levadura apropiadas para expresar los péptidos de la presente invención incluyen Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Candida, Pichia pastoris, o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los medios y métodos correspondientes son bien conocidos en la técnica. Asimismo son bien conocidos en la técnica los métodos para aislar y purificar péptidos producidos de forma recombinante, e incluyen, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.

35 Los péptidos de acuerdo con la presente invención son capaces de inducir anticuerpos que se unen específicamente a PCSK9 humana e inhiben la degradación de LDLR mediada por PCSK9.

40 Para facilitar el aislamiento de los péptidos de la presente invención, se pueden obtener polipéptidos de fusión en los que los péptidos se fusionan traduccionalmente (enlazan covalentemente) a un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento por cromatografía de afinidad. Los polipéptidos heterólogos típicos son etiqueta de His (por ejemplo, His6; 6 restos de histidina), etiqueta de GST (glutathion-S-transferasa), etc. El polipéptido de fusión facilita no sólo la purificación de los péptidos, sino asimismo puede evitar la degradación de los péptidos durante las etapas de purificación. Si se desea eliminar el polipéptido heterólogo después de la purificación, el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de escisión en la unión entre el péptido y el polipéptido heterólogo. El sitio de escisión puede consistir en una secuencia de aminoácidos que se escinde con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio (por ejemplo, proteasas).

45 La vacuna y péptidos de la presente invención se pueden administrar a cualquier tipo de mamífero, incluyendo seres humanos. Sin embargo, se prefiere administrar la vacuna y péptidos de la presente invención a los seres humanos.

50 **Tabla A: Restos de aminoácidos**

Aminoácido	Códigos de tres letras	Código de una letra
alanina	ala	A
arginina	arg	R
aspargina	asn	N
ácido aspártico	asp	D
cisteína	cys	C
ácido glutámico	glu	E
glutamina	gln	Q
glicina	gly	G
histidina	his	H
isoleucina	ile	I
leucina	leu	L
lisina	lys	K
metionina	met	M

Aminoácido	Códigos de tres letras	Código de una letra
fenilalanina	phe	F
prolina	pro	P
serina	ser	S
treonina	thr	T
triptófano	trp	W
tirosina	tyr	Y
valina	val	V

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, por lo menos un péptido comprendido en la vacuna de la presente invención comprende en su extremo N- y/o C-terminal por lo menos un resto de cisteína unido directamente o a través de una secuencia espaciadora al mismo.

5

Este resto de cisteína puede servir como un grupo reactivo con el fin de unir el péptido a otra molécula o un portador. Por ejemplo, este grupo puede ser usado para unir el péptido a una proteína portadora. El resto de cisteína puede estar unido directamente a los péptidos de la presente invención, o a través de una secuencia espaciadora. La secuencia espaciadora comprende preferentemente por lo menos uno, preferentemente por lo menos dos, más preferentemente por lo menos tres, incluso más preferentemente por lo menos cuatro, y opcionalmente un máximo de diez, preferentemente un mínimo de cinco restos de aminoácidos no polares pequeños tales como glicinas.

10

Sin embargo, resulta evidente que tales restos de cisteína u otros enlazadores de aminoácidos (tales como, por ejemplo, CG-, CCG-, -GC, -GGC, etc.) no deben ser considerados como los intercambios (N- o C-terminal) o variaciones del epítipo del péptido de la PCSK9 nativa PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1) o sus fragmentos, sino adiciones a la secuencia del epítipo que provocan la respuesta de anticuerpos específicos en el individuo vacunado.

15

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la vacuna de acuerdo con la presente invención comprende un portador proteico, preferentemente un portador proteico seleccionado de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), CRM (Preferentemente CRM197), toxoide tetánico (TT), toxina de la difteria (DT), proteína D, o cualquier otra proteína o péptido que contenga epítopos de linfocitos T de auxiliares.

20

25

De acuerdo con la presente invención, el péptido está acoplado o fusionado preferentemente a un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana), CRM, toxoide tetánico, proteína de unión a albúmina, seroalbúmina bovina, un dendrímero, enlazadores peptídicos (o regiones flanqueantes), así como las sustancias adyuvantes descritas en Singh *et al.* (Singh *et al.*, Nat. Biotech. 17, (1999): 1075-1081 (en particular las de la tabla 1 de ese documento)), y O'Hagan *et al.* (O'Hagan and Valiante, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9); (2003): 727-735 (en particular, los compuestos inmunopotenciadores endógenos y sistemas de suministro descritos allí)), o mezclas de los mismos. La química de conjugación (por ejemplo, a través de compuestos heterobifuncionales tales como GMBS y, por supuesto, asimismo otros como se describen en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson), en este contexto, se puede seleccionar de reacciones conocidas por un experto en la materia.

30

35

Alternativamente, asimismo es posible fusionar el por lo menos un péptido de la presente invención a un vehículo proteico por métodos conocidos en la técnica. Tales proteínas comprenden un péptido como se describe en la presente memoria junto con una proteína inmunógena no relacionada. Preferentemente, la proteína inmunógena es capaz de provocar una respuesta de recuerdo. Ejemplos de tales proteínas incluyen tétanos, tuberculosis, proteínas 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 usa un derivado de proteína D que comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales) y que puede estar lipidado. Otro portador que se puede usar para proporcionar proteínas de fusión puede ser la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (preferentemente una porción C-terminal). LYTA deriva de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; Gene 43; (1986): 265-292). LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en la cadena principal de peptidoglicanos. Dentro de una forma de realización preferida, una porción de repetición de LYTA se puede incorporar en una proteína de fusión. Una porción de repetición se encuentra en la región C-terminal partiendo del resto 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los restos 188-305.

40

45

50

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido se formula con un adyuvante, preferentemente adsorbido a hidróxido de aluminio (Alhydrogel, Al(OH)₃).

55

La vacuna de acuerdo con la presente invención puede formularse con un adyuvante, preferentemente una composición de aluminio poco soluble, en particular hidróxido de aluminio. Por supuesto, asimismo se pueden usar

adyuvantes como MF59, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), saponinas (por ejemplo, QS21), derivados de MDP, oligonucleótidos CpG, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (por ejemplo, adyuvante de Freund, SAF), liposomas, virosomas, iscoms, cocleados, micropartículas de PLG, partículas de poloxámero, partículas de tipo vírico, enterotoxina termolábil (ET), toxina del cólera (TC), toxinas mutantes (por ejemplo, LTK63 y LTR72), micropartículas y/o liposomas polimerizados.

Los adyuvantes apropiados están comercialmente disponibles como, por ejemplo, AS01B, AS02A, AS15, AS-2, y derivados de los mismos (GlaxoSmithKline, Filadelfia, PA); CWS, TDM, Leif, sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A. Asimismo se pueden usar como adyuvantes las citocinas, tales como GM-CSF o interleucina-2, -7 o -12.

Los adyuvantes preferidos para uso en la obtención de una respuesta predominantemente de tipo Th1 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, Ribí *et al.*, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, (1986): 407-419; documentos GB 2 122 204 B; GB 2220211 y patente US nº 4.912.094). Una forma preferida de 3D-MPL es una emulsión que tiene un tamaño de partículas pequeño inferior a 0.2 µm de diámetro, y su método de fabricación se describe en el documento WO 94/21292. Las formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo se han descrito en el documento WO 98/43670. Los adyuvantes preferidos ejemplificados 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 aceite en agua, y AS 15. Los adyuvantes de MPL se describen, por ejemplo, en 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 está metilado) asimismo inducen una respuesta predominantemente de Th1. CpG es una abreviatura para motivos de dinucleótido de citosina-guanosina presentes en el ADN. Tales oligonucleótidos son bien conocidos, y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488, patentes US nº 6.008.200 y US nº 5.856.462. Asimismo se describen secuencias de ADN inmunoestimulantes, por ejemplo por Sato *et al.*, Science 273; (1996):352. CpG, cuando se formula en vacunas, se administra generalmente en disolución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente a un antígeno (documento WO 98/16247), o formulado con un portador tal como hidróxido de aluminio ((antígeno de superficie de hepatitis) Davis *et al.*, *supra*; Brazolot-Millan *et al.*, PNAS USA, 95(26), (1998):15553-8). CpG es conocido en la técnica como un adyuvante que se puede administrar tanto por vía sistémica como mucosal (documentos WO 96/02555, EP 0 468 520, Davis *et al.*, J. Immunol, 160(2), (1998):870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 161(9), (1998):4463-6).

Otro adyuvante preferido es una saponina, o miméticos o derivados de saponina, preferentemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc.), que pueden usarse solos 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, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactiva, en la que QS21 se inactiva con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. Adyuvantes de saponina adicionales de uso en la presente invención incluyen QS7 (descritos en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711) y QS17 (descrito en la patente US nº 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1).

Otros adyuvantes preferidos incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos de América), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (por ejemplo, SBAS-2, AS2', AS2, SBAS-4, o SBAS6, disponible en GlaxoSmithKline), Detox (Corixa), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros 4-fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGPs). Los adyuvantes ejemplificativos adicionales incluyen MPL sintético y adyuvantes basados en la subunidad B de la toxina Shiga (ver el documento WO 2005/112991). Se prefiere particularmente usar hidróxido de aluminio como adyuvante.

La vacuna de la presente invención se puede administrar por cualquier vía apropiada conocida para las vacunas, preferentemente por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica, o por vía intravenosa. Dependiendo de la vía de administración, el medicamento puede comprender portadores, adyuvantes y/o excipientes respectivos.

Una vacuna que comprende un péptido de la presente invención y el portador farmacéuticamente aceptable puede ser administrada por cualquier modo adecuado de aplicación, por ejemplo por vía intradérmica (i.d), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intranasal, oral, subcutánea (s.c.), etc., y en cualquier dispositivo adecuado de suministro (O'Hagan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735). Los péptidos de la presente invención se formulan preferentemente para administración intradérmica, subcutánea o intramuscular. Los medios y métodos para obtener formulaciones respectivas son conocidos por un experto en la materia.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la vacuna se usa para el tratamiento y/o la prevención de trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular, o insuficiencias venosas periféricas, y otras enfermedades relacionadas con PCSK9, por ejemplo enfermedades neoplásicas, tales como metástasis de melanoma y cáncer de hígado (Sun *et al*, Neoplasia, 14(12) 2012, 1122-1131), en particular, en mamíferos, preferentemente en seres humanos.

Como se indica, 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 aumento del receptor de lipoproteína de baja densidad en hepatocitos del hígado *in vivo*, aumento de la absorción de colesterol en plasma, y la posterior reducción de los niveles de colesterol de LDL en plasma y de este modo los niveles de colesterol total.

En particular, la presente invención describe anticuerpos capaces de unirse a la región PCSK9 de aa209-222 e influir negativamente en la interacción PCSK9/LDLR, y por lo tanto reducir beneficiosamente el colesterol en plasma. Estos anticuerpos bloquean asimismo la escisión de la proteína PCSK9 madura (aa153-692) mediante furina, y por lo tanto inhiben la producción de la forma truncada de PCSK9 (aa219-692) que se une a LDLR. Además, los péptidos de la presente invención son capaces de inducir la formación de anticuerpos que son capaces de unirse a PCSK9 en la región de 209-222 e inhibir el proceso de escisión por furina de la PCSK9 madura.

La enfermedad asociada con aterosclerosis se selecciona preferentemente del grupo que consiste en enfermedad arterial periférica oclusiva, cardiopatía coronaria, ataque cerebral apopléjico, y accidente cerebrovascular.

Las expresiones "enfermedades asociadas con hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" y "trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis" se refieren a enfermedades que son consecuencia de la hiperlipidemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis. Estas enfermedades incluyen, entre otras, enfermedad arterial periférica oclusiva, cardiopatía coronaria, y ataque cerebral apopléjico (véanse, por ejemplo, Steinberg, D. J Lipid Res 46(2005):179-190 y Steinberg, D. J Lipid Res 47(2006):1339-1351).

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, los péptidos de la presente invención se administran a un mamífero o un 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. En una forma de realización preferida, estas cantidades se refieren a todos los péptidos (si se utiliza más de un péptido en la vacuna) presentes en la vacuna. En otra forma de realización preferida, estas cantidades se refieren a cada fragmento individual presente en la vacuna. Por supuesto, es posible proporcionar una vacuna en la que los péptidos están presentes en cantidades diferentes o iguales. Sin embargo, los péptidos de la presente invención se pueden administrar, como alternativa, a un mamífero o un individuo en una cantidad de 0.1 ng a 10 mg, preferentemente 10 ng a 1 mg, en particular 100 ng a 300 µg/kg de peso corporal.

La cantidad de péptidos que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. La dosis de la vacuna puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del mamífero o individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas, o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. La dosis de la vacuna asimismo puede variarse para proporcionar respuesta a la dosis preventiva óptima, dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, los péptidos y la vacuna de la presente invención se pueden administrar a un individuo a intervalos de varios días, una o dos semanas, o incluso meses o años, dependiendo siempre del nivel de anticuerpos dirigidos contra PCSK9.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido/vacuna se aplica entre 2 y 10, preferentemente entre 2 y 7, y todavía más preferentemente hasta 5. Este número de inmunizaciones puede conducir a una inmunización básica. En una forma de realización particularmente preferida, el intervalo de tiempo entre las vacunaciones posteriores se elige para que sean entre 2 semanas y 5 años, preferentemente entre 1 mes y hasta 3 años, más preferentemente 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 hasta 6 meses, seguido preferentemente de otras administraciones después de tales vacunaciones iniciales. A continuación, la vacunación puede repetirse, por ejemplo, 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 asimismo puede comprender antígenos derivados de otras proteínas. Por ejemplo, las proteínas implicadas en la regulación de los niveles de LDL y/o HDL en un cuerpo humano. Por ejemplo, los fragmentos de PCSK9 de la presente invención se pueden combinar con epítomos derivados de la proteína CETP humana. La vacuna de la presente invención asimismo puede comprender antígenos derivados de un epítomo diferente de la proteína PCSK9.

La vacuna de la presente invención asimismo puede comprender antígenos derivados de otras proteínas adecuadas para el tratamiento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular, o enfermedades vasculares periféricas.

5 Típicamente, la vacuna contiene los péptidos de la presente invención en una cantidad de 0.5 a 500 μg , preferentemente 1 a 100 μg , y alternativamente de 0.1 ng a 10 mg, preferentemente 10 ng a 1 mg, en particular 100 ng a 100 μg , o, alternativamente, por ejemplo, 100 fmoles a 10 μmoles , preferentemente 10 pmoles a 1 μmol , en particular, 100 pmoles a 100 nmoles. Típicamente, la vacuna asimismo puede contener sustancias auxiliares, por ejemplo disoluciones amortiguadoras, estabilizantes, etc.

Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar un individuo que sufre o está en riesgo de sufrir aterosclerosis o una enfermedad asociada con aterosclerosis, en el curso de la cual se administra al individuo un péptido o vacuna de acuerdo con la presente invención.

15 Después de la vacuna de la presente invención, la persona a tratar puede recibir asimismo otros principios activos que se sabe que influyen en los niveles de LDL y/o HDL en seres humanos y mamíferos, tales como estatinas, fibratos, ácido nicotínico, inhibidor de la captación de colesterol (por ejemplo, ezetimibe), ApoA1 Milano, HDL deslipidado, esteroides vegetales. Se prefiere particularmente administrar a un individuo la vacuna de la presente invención junto (es decir, al mismo tiempo, consecutivamente, etc.) con estatinas. La vacuna de la presente invención asimismo se puede combinar con métodos como aféresis de LDL. La aféresis de LDL es una forma de aféresis para eliminar la lipoproteína de baja densidad de las partículas que contienen colesterol (LDL) del torrente sanguíneo. Típicamente, la aféresis de LDL trabaja conduciendo la sangre venosa a través de una columna revestida con anticuerpos contra apolipoproteína B (la proteína principal de las partículas de LDL), sulfato de dextrano o poliacrilato, o por precipitación de LDL con heparina a pH bajo. Los métodos respectivos son conocidos para un experto en la materia.

El término "prevención", como se usa en la presente memoria, se refiere a medidas no sólo para prevenir la aparición de enfermedades, tales como la reducción del factor de riesgo, sino asimismo para detener su avance y atenuar sus consecuencias una vez establecidas.

35 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 con la enfermedad cuando se utiliza en los métodos de cribado de la presente invención se puede identificar de ese modo como un compuesto terapéutico. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Por ejemplo, aquellos que pueden beneficiarse del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen aquellos que ya tienen una enfermedad y/o trastorno, así como aquellos en los que será prevenida una enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

40 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el ejemplo y las figuras siguientes, sin embargo, sin estar limitada a los mismos.

45 Figura 1 Proteína ELISA

Las figuras 1A y 1B representan la comparación de los títulos medios ($n = 5$ ratones/grupo) frente a la proteína PCSK9 humana inducida por las secuencias indicadas.

50 Los datos revelan la capacidad de los VARIOTOPE® seleccionados para inducir títulos más elevados de anticuerpos contra la proteína PCSK9 humana en comparación con la secuencia nativa (SEC. 1: PEEDGTRFHRQASK).

Figuras 2% de colesterol total en comparación con el grupo de control negativo, establecido como 100%.

55 La figura 2A representa la comparación del % de los niveles de colesterol total medios ($n = 3$ ratones/grupo) de ratones inmunizados con VARIOTOPE® inmunógenos seleccionados (SEC. 10: PQEDGTRFHRQASK, SEC. 17: PEEDGTRFHRRASK, SEC. 18: PEEDGTRFHRKASK, SEC. 23: PEEDGTRFHRQASR) en comparación con un grupo de control negativo inmunizado con el péptido irrelevante, y con la secuencia de PCSK9 original nativa (SEC. 1: PEEDGTRFHRQASK). Obsérvese la capacidad de los VARIOTOPE® para reducir los niveles de colesterol total hasta niveles similares o aún más bajos en comparación con la secuencia nativa.

65 La figura 2B representa la comparación del % de los niveles de colesterol total medios ($n = 5$ ratones/grupo) de ratones inmunizados con VARIOTOPE® inmunógeno seleccionado (SEC. 36: PEEDGTRFHRTASK) en comparación con un grupo de control negativo inmunizado con el péptido irrelevante, y con la secuencia PCSK9 original nativa (SEC. 1: PEEDGTRFHRQASK). Obsérvese la capacidad del VARIOTOPE® para reducir los niveles de colesterol total más fuertemente en comparación con la secuencia nativa.

La figura 2C representa la comparación del % de los niveles de colesterol total medios (n = 5 ratones/grupo) de ratones inmunizados con VARIOTOPE® seleccionado con múltiples intercambios de aa (SEC. 41: PEEDGSRFHKQASK y SEC. 44: PEEDGSRFHRQATK) en comparación con un grupo de control negativo inmunizado con el péptido irrelevante y con la secuencia PCSK9 original nativa (SEC. 1: PEEDGTRFHRQASK). Obsérvese la capacidad del VARIOTOPE® para reducir los niveles de colesterol total más fuertemente en comparación con la secuencia nativa.

Figura 3. Inhibición de la escisión por furina y producción de PCSK9 truncada escindida por furina.

La figura 3 revela la capacidad de los VARIOTOPE® muy inmunógenos seleccionados (SEC. 10: PQEDGTRFHRQASK, SEC. 17: PEEDGTRFHRQASK, SEC. 18: PEEDGTRFHRKASK, SEC. 23: PEEDGTRFHRQASR) para inducir anticuerpos que son capaces de inhibir la escisión por furina de la PCSK9 madura (aa153-692), y de este modo anular la producción de PCSK9 truncada (producto de ~ 50 kDa) (aa219-692). El proceso de escisión se compara con control negativo (PCSK9 incubada con plasma procedente de ratones inyectados con péptido irrelevante) y controles positivos (huPCSK9 incubada con o sin furina).

La figura 4 representa el % de colesterol total (TC) en comparación con el grupo de control negativo, establecido como 100%.

La figura 5 representa el % de diferencia de TC de grupos tratados con VARITOPE® en comparación con el grupo tratado con la secuencia original, establecida como 0.

La figura 6 representa el % de diferencia de TC de grupos tratados con VARITOPE® en comparación con el grupo tratado con la secuencia original, establecida como 0.

Ejemplos

Materiales y métodos

Vacuna:

Los péptidos se conjugaron a través del ligador heterobifuncional GMBS (éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-maleimidobutírico) a KLH (hemocianina de lapa californiana).

Experimentos con animales:

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

Se inyectaron a los ratones cuatro veces en intervalos de 2 semanas con 15 µg de péptido puro acoplado a KLH y adsorbido a Alhydrogel como adyuvante en un volumen de 1 ml en total.

La sangre se tomó aproximadamente 2 semanas después de la inyección final.

ELISA de proteína:

Para determinar la inmunogenicidad de las vacunas, e identificar de este modo la cantidad de anticuerpos específicos para PCSK9 en el plasma de animales inmunizados, se realizó el inmunoensayo ELISA. El inmunoensayo ELISA genera una señal que se puede cuantificar fácilmente, y representa una medida cuantitativa de la cantidad de anticuerpos específicos de PCSK9 inducidos por la vacuna. Así, los títulos medidos por ELISA se correlacionan directamente con la cantidad (µg/ml) de anticuerpos específicos diana en la muestra de plasma de animales tratados. Todas las muestras de plasma se recogieron dos semanas después de la inmunización final, y se trataron por igual. A fin de tener una comparación directa, se llevó a cabo simultáneamente para todas las muestras la evaluación cuantitativa por el inmunoensayo ELISA de proteína PCSK9 de los anticuerpos específicos de PCSK9 inducidos por la vacuna, y la comparación con sus controles relativos (secuencias originales y control negativo). Para este fin, las placas de ELISA se recubrieron con la proteína PCSK9 humana expresada de forma recombinante. La unión no específica fue bloqueada mediante incubación con disolución amortiguadora de bloqueo (BSA al 1% en PBS). Diluciones de suero apropiadas (con una dilución de partida de 1:100) se añadieron a los pocillos, se diluyeron en serie 1:2 veces (12 etapas de dilución), y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con anticuerpo IgG anti-ratón, se añadió ABTS como sustrato, y se midió la OD a 405 nm. Como control negativo, se analizaron los sueros del grupo de control inyectado con un péptido irrelevante. Los títulos se definieron como la dilución del suero en la que se alcanzó el 50% de la OD_{max} en el ensayo.

Ensayo de colesterol total:

5 Todas las muestras de plasma se recogieron dos semanas después de la inmunización final, y fueron tratadas por igual. Las medidas de colesterol total (TC) se realizaron de forma simultánea para todas las muestras, y se compararon lado a lado con sus controles relacionados (secuencia original y control negativo). La medida cuantitativa simultánea de los niveles de TC en plasma, en mg/dl, se realizó mediante el kit de colesterol LabAssay™ (Wako). En detalle, al incubar con el reactivo cromógeno que contiene colesterol esterasa, los ésteres de colesterol en las muestras se descompusieron en colesterol libre y ácidos grasos. Posteriormente, el colesterol libre se oxidó mediante la colesterol oxidasa, lo que conduce a la liberación simultánea de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido deja que DAOS y 4-Aminoantipirina se oxiden y se condensen cuantitativamente mediante peroxidasa (HRP), lo que produjo pigmento azul. La densidad óptica se midió a 600 nm, y la cuantificación del TC se calculó de acuerdo con una curva estándar.

Inhibición de la escisión por furina

15 La reacción de escisión por furina se llevó a cabo con 2 unidades de furina (~ 110 ng) (New England Biolabs) en disolución amortiguadora de PCSK9 que contiene 100 mM de disolución amortiguadora de Hepes, pH 7.5, 5% de Triton-X y 1 mM de CaCl. En detalle, se incubaron 4 µl de plasma de ratón, procedente de ratones vacunados con VARIOTOPE®, con 250 ng de huPCSK9 biotinilada (BPS Bioscience) en disolución amortiguadora de PCSK9, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 2U de Furina (~ 110 ng) (New England Biolabs) a la disolución de reacción, y se incubó durante toda la noche a RT. El producto de reacción se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Resultados:

25

1. Información de secuencia y títulos contra huPCSK9 (OD_{max}/2):

SEC. ID	Secuencia	OD _{max} /2
SEC. 1	PEEDGTRFHRQASK	12074
SEC. 2	AEEDGTRFHRQASK	36869
SEC. 3	PAEDGTRFHRQASK	2774
SEC. 4	PEEDGTRFARQASK	21494
SEC. 5	PEEDGTRFHAQASK	33442
SEC. 6	PEEDGTRFHRAASK	22475
SEC. 7	PEEDGTRFHRQAAK	15676
SEC. 8	PEEDGTRFHRQASA	23638
SEC. 9	TEEDGTRFHRQASK	23944
SEC. 10	PQEDGTRFHRQASK	29228
SEC. 11	PKEDGTRFHRQASK	6610
SEC. 12	PEEDGSRFHRQASK	12636
SEC. 13	PEEDGTRFHQQASK	18490
SEC. 14	PEEDGTRFHKQASK	17795
SEC. 15	PEEDGTRFHMQASK	15556
SEC. 16	PEEDGTRFHREASK	18670
SEC. 17	PEEDGTRFHRRASK	28996
SEC. 18	PEEDGTRFHRKASK	30537
SEC. 19	PEEDGTRFHRQSSK	41310
SEC. 20	PEEDGTRFHRQATK	10813
SEC. 21	PEEDGTRFHRQANK	15303
SEC. 22	PEEDGTRFHRQALK	8694
SEC. 23	PEEDGTRFHRQASR	14722
SEC. 24	PEEDGTRFHRQASL	19471
SEC. 25	KEEDGTRFHRQASK	19315
SEC. 26	PEWDGTRFHRQASK	840
SEC. 27	PEEDKTRFHRQASK	7154
SEC. 28	PEEDGTGFHRQASK	0
SEC. 29	PEEDGTRFSRQASK	33111
SEC. 30	PEEDGTRFTRQASK	9519
SEC. 31	PEEDGTRFVRQASK	11850
SEC. 32	PEEDGTRFGRQASK	822
SEC. 33	PEEDGTRFMRQASK	10651
SEC. 34	PEEDGTRFHPQASK	20318
SEC. 35	PEEDGTRFHSQASK	29223

SEC. ID	Secuencia	ODmax/2
SEC. 36	PEEDGTRFHRTASK	29984
SEC. 37	PEEDGTRFHRQTSK	25826
SEC. 38	PEEDGTRFHRQASS	31481
SEC. 39	PEEDGTRFHRQAST	13172
SEC. 40	PEEDGTRFHRQASV	22678
SEC. 41	PEEDGSRFHKQASK	37296
SEC. 42	PEEDGSRFHMQASK	18599
SEC. 43	PEEDGSRFHRRASK	29435
SEC. 44	PEEDGSRFHRQATK	20684
SEC. 45	PEEDGSRFHRRATK	11097
SEC. 46	X ₁ X ₂ EDGX ₆ RFX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄	

Estos resultados asimismo se muestran en la figura 1. De acuerdo con la presente invención, aquellos VARIOPTOPE® que tienen el potencial de provocar un título más alto frente huPCSK9 (por ejemplo, medido como ODmax/2) de acuerdo con el presente ejemplo) se consideran como variantes inmunopotenciadoras de la secuencia nativa PEEDGTRFHRQASK. Un VARIOPTOPE® preferido de acuerdo con la presente invención tiene una propiedad inmunopotenciadora pronunciada (medida, por ejemplo, como una ODmax/2 en el presente ejemplo de por encima de 20000 o como un aumento de este efecto hasta 150%, preferentemente de duplicación de este efecto, en comparación con la secuencia nativa). Un VARIOPTOPE® aún más preferido de acuerdo con la presente invención tiene una propiedad inmunopotenciadora aún más pronunciada (medida, por ejemplo, como una ODmax/2 en el presente ejemplo de por encima de 25000, preferentemente de por encima de 30000, o como una triplicación de este efecto, en comparación con la secuencia nativa).

2. El colesterol total en % comparado con el grupo de control, establecido como 100%, en ratones inmunizados con los VARIOPTOPE® con un solo intercambio de AA (SEC. 10, 17, 18 y 23; figura 2A y SEC. 36 2B) y múltiples intercambios (SEC. 41, 44; figura 2C).

Figura 2A

TC en %		
	Control Negativo	100
SEC. 1	PEEDGTRFHRQASK (secuencia original)	81
SEC. 10	PQEDGTRFHRQASK	78
SEC. 17	PEEDGTRFHRRASK	81
SEC. 18	PEEDGTRFHRKASK	81
SEC. 23	PEEDGTRFHRQASR	70

Figura 2B

TC en %		
	Control Negativo	100
SEC. 1	PEEDGTRFH RQASK (secuencia original)	89
SEC. 36	PEEDGTRFHRTASK	72

Figura 2C

TC en % múltiples intercambios de AA		
	Control Negativo	100
SEC. 1	PEEDGTRFHRQASK (secuencia original)	81
SEC. 41	PEEDGSRFHKQASK	66
SEC. 44	PEEDGSRFHRQATK	74

Estos resultados asimismo se muestran en la figura 2. De acuerdo con la presente invención, se prefieren aquellos VARIOPTOPE® que tienen el potencial de provocar una reducción comparable de TC en comparación con la secuencia nativa PEEDGTRFHRQASK. Por supuesto, un VARIOPTOPE® aún más preferido de acuerdo con la presente invención tiene la capacidad de reducir TC hasta una cantidad incluso mayor que la secuencia nativa (medida, por ejemplo, como una reducción en % de TC, como se mide en el presente ejemplo, de más de 5%, especialmente más de 10% (absoluto, es decir, en comparación con el control negativo), en comparación con la secuencia nativa).

3. El análisis de transferencia Western revela la capacidad de los anticuerpos inducidos, con la inmunización con SEC. 10, 17, 18 y 23, de inhibir la formación de PCSK9 truncada escindida por furina (a219-692; ~ 50 kDa) (ver la figura 3).

Reducción de colesterol total (TC) en animales tratados

Se realizaron experimentos adicionales a fin de ofrecer más evidencia experimental que muestre que los candidatos de vacunas de VARIOTOPE® seleccionados tienen la capacidad de reducir el colesterol total (TC) en animales tratados en un grado mayor que una vacuna que contiene la secuencia nativa correspondiente (original).

5

Péptidos usados para inmunizaciones en los siguientes experimentos:

SEC. 1: PEEDGTRFHRQASK (secuencia nativa original)
 SEC. 2: AEEDGTRFHRQASK
 SEC. 9: TEEDGTRFHRQASK
 SEC. 10: PQEDGTRFHRQASK
 SEC. 17: PEEDGTRFHRRASK
 SEC. 18: PEEDGTRFHRKASK
 SEC. 23: PEEDGTRFHRQASR
 SEC. 36: PEEDGTRFHRTASK
 SEC. 24: PEEDGTRFHRQASL

10 A fin de evaluar la capacidad de candidatos de vacunas de VARIOTOPE® seleccionados para reducir TC, y comparar la magnitud de la reducción de TC en animales tratados con VARIOTOPE® con la reducción de TC en animales tratados con una vacuna que contiene la secuencia original, se inyectaron 5 a 10 ratones por grupo cinco veces en intervalos de 2 semanas con vacunas que contienen 1 µg de péptido puro. Como es usual, los péptidos antigénicos se acoplaron a KLH y se adsorbieron a Alhydrogel al 0.2% como adyuvante, en un volumen de 1 ml en total. Para los experimentos descritos, se usó material similar a GMP. Se tomaron muestras de sangre
 15 aproximadamente 2 semanas después de la inyección final.

En un primer experimento, se ensayaron las vacunas que contienen la secuencia original y que contienen los siguientes VARIOTOPE®:

SEC. 1: PEEDGTRFHRQASK
 SEC. 9: TEEDGTRFHRQASK
 SEC. 17: PEEDGTRFHRRASK
 SEC. 18: PEEDGTRFHRKASK
 SEC. 23: PEEDGTRFHRQASR

20

A fin de incluir una vacuna que se sabe que es capaz de reducir los niveles de TC en animales tratados, pero que es inferior reduciendo los niveles de TC en comparación con la vacuna que contiene la secuencia original, se incluyó en este experimento la siguiente vacuna de péptido: SEC. 24: PEEDGTRFHRQASL

25 Como ya se ha resumido anteriormente (figura 1A), todos los candidatos de vacunas son altamente inmunógenos y tienen la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos que se unen eficazmente a huPCSK9, así como a PCSK9 de ratón. A fin de demostrar la eficacia de los anticuerpos inducidos, se realizaron medidas de TC de muestras de sangre derivadas de ratones individuales. La figura 4 representa los valores medios de TC del grupo relativo (en %) en comparación con el grupo de control, establecido como 100%. En este experimento, se
 30 inmunizaron 5 animales por grupo. Como puede observarse, en todos los grupos tratados con la vacuna, los valores de TC se redujeron significativamente en comparación con el grupo de control.

Puesto que el objetivo de este experimento fue comparar grupos tratados con VARIOTOPE® con el grupo tratado con la secuencia nativa original, en la figura 5 se presenta el % de reducción de los valores de TC de los grupos
 35 tratados con la vacuna en comparación con el grupo tratado con la secuencia original, establecida como 0%.

Como se muestra en la figura 5, las vacunas que contienen las secuencias

SEC. 9: TEEDGTRFHRQASK
 SEC. 17: PEEDGTRFHRRASK
 SEC. 18: PEEDGTRFHRKASK
 SEC. 23: PEEDGTRFHRQASR

40 son 3 a 10% más potentes para reducir los niveles de TC en comparación con la vacuna que contiene la secuencia original. En contraste con esto, la vacuna que contiene el SEC. 24: PEEDGTRFHRQASL posee la capacidad de reducir los niveles de TC en comparación con el control negativo (figura 4), pero en comparación con la vacuna que contiene el péptido original, los niveles de TC eran más altos (+9%).

45 En un experimento adicional, se ensayaron los siguientes VARIOTOPE®, y se compararon nuevamente con SEC. 1:

SEC. 2: AEEDGTRFHRQASK

SEC. 10: PQEDGTRFHRQASK
SEC. 36: PEEDGTRFHRTASK

En este experimento, se inyectaron 10 animales por grupo cinco veces en intervalos de 2 semanas con vacunas que contienen 1 µg de péptido puro. Las muestras de sangre se tomaron de nuevo aproximadamente 2 semanas después de la inyección final. A fin de comparar la reducción de TC en estos animales directamente con los valores de TC en animales tratados con la secuencia original, en la figura 6 se presenta el % de reducción de los valores de TC de los grupos tratados con la vacuna VARITOPE® en comparación con el grupo tratado con la secuencia original, establecida como 0%.

Como se muestra en la figura 6, los tres candidatos de vacunas ensayados en este experimento fueron más potentes reduciendo los niveles de TC en comparación con la vacuna que contiene la secuencia original (-7% a -13%).

Sobre la base de la descripción, se pueden destacar específicamente los siguientes aspectos preferidos:

1. Vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en 9 a 25 restos de aminoácidos, siendo dicho péptido una variante del péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1) con un aumento de la inmunogenicidad en mamíferos, especialmente seres humanos, en comparación con PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), y en la que dicha variante se caracteriza por que presenta por lo menos uno y como máximo cuatro intercambios de aminoácidos en comparación con PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), en la que dicha variante se selecciona preferentemente del grupo que consiste en AEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 2), TEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 9), PQEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 10), PEEDGTRFHRRASK (SEC ID nº 17), PEEDGTRFHRKASK (SEC ID nº 18), PEEDGTRFHRQASR (SEC ID nº 23), and PEEDGTRFHRTASK (SEC ID nº 36).

2. Vacuna de acuerdo con la forma de realización 1, que comprende por lo menos un péptido que consiste en 9 a 25 restos de aminoácidos, teniendo o comprendiendo dicho péptido la secuencia de aminoácidos

X₁X₂EDGX₆RFX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄, (SEC ID nº 46),

en la que

X₁ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en lisina, treonina, alanina y prolina, preferentemente alanina o prolina,

X₂ es glutamina o ácido aspártico, preferentemente ácido aspártico,

X₆ es treonina o serina,

X₉ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en histidina, alanina y serina,

X₁₀ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, alanina, glutamina, lisina, metionina, prolina y serina, preferentemente arginina, serina o alanina,

X₁₁ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en glutamina, alanina, ácido glutámico, lisina, treonina, y arginina, preferentemente glutamina, lisina, arginina, y treonina,

X₁₂ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina, serina y treonina, preferentemente alanina o serina,

X₁₃ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en serina, alanina, y asparagina, preferentemente serina,

X₁₄ es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en lisina, alanina, arginina, leucina, serina, treonina, y valina, preferentemente lisina o serina,

o un fragmento de SEC ID nº 46 que tiene por lo menos 9 restos de aminoácidos consecutivos, y

en el que SEC ID nº 46 no es PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1) o un fragmento N- o C-terminalmente truncado del mismo.

3. Vacuna de acuerdo con la forma de realización 1 o 2, en la que el péptido consiste en o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AEEDGTRFHRQASK, PEEDGTRFARQASK, PEEDGTRFHAQASK, PEEDGTRFHRAASK, PEEDGTRFHRQAAK, PEEDGTRFHRQASA, TEEDGTRFHRQASK, PQEDGTRFHRQASK, PEEDGSRFHRQASK, PEEDGTRFHQQASK, PEEDGTRFHKQASK, PEEDGTRFHMQASK, PEEDGTRFHREASK,

PEEDGTRFHRRASK, PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRQSSK, PEEDGTRFHRQANK,
 PEEDGTRFHRQASR, PEEDGTRFHRQASL, KEEDGTRFHRQASK, PEEDGTRFSRQASK,
 PEEDGTRFMRQASK, PEEDGTRFHPQASK, PEEDGTRFHSQASK, PEEDGTRFHRTASK,
 PEEDGTRFHRQTSK, PEEDGTRFHRQASS, PEEDGTRFHRQAST, PEEDGTRFHRQASV,
 5 PEEDGSRFHKQASK, PEEDGSRFHMQASK, PEEDGSRFHRRASK, y PEEDGSRFHRQATK;
 preferentemente AEEDGTRFHRQASK, PEEDGTRFARQASK, PEEDGTRFHAQASK, PEEDGTRFHRAASK,
 PEEDGTRFHRQASA, TEEDGTRFHRQASK, PQEDGTRFHRQASK, PEEDGTRFHRRASK,
 PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRQSSK, PEEDGTRFSRQASK, PEEDGTRFHPQASK,
 10 PEEDGTRFHSQASK, PEEDGTRFHRTASK, PEEDGTRFHRQTSK, PEEDGTRFHRQASS,
 PEEDGTRFHRQASV, PEEDGSRFHKQASK, PEEDGSRFHRRASK, y PEEDGSRFHRQATK; especialmente
 AEEDGTRFHRQASK, PEEDGTRFHAQASK, PQEDGTRFHRQASK, PEEDGTRFHRRASK
 PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRQSSK, PEEDGTRFSRQASK, PEEDGTRFHSQASK,
 PEEDGTRFHRTASK, PEEDGTRFHRQTSK, PEEDGTRFHRQASS, PEEDGSRFHKQASK y
 PEEDGSRFHRRASK.

15 4. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 3, en la que por lo menos un péptido está acoplado o fusionado con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 5. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 4, en la que por lo menos un péptido comprende, en su término N y/o C, por lo menos un resto de cisteína unido directamente o a través de una secuencia espaciadora al mismo.

25 6. Vacuna de acuerdo con la forma de realización 4 o 5, en la que el portador farmacéuticamente aceptable es un portador proteínico.

30 7. Vacuna de acuerdo con la forma de realización 6, en la que el portador proteínico se selecciona del grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetánico (TT), CRM197, proteína D, o una toxina de la difteria (DT), preferentemente una toxina de la difteria mutada, CRM197, o KLH, especialmente KLH.

35 8. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 7, en la que la vacuna se formula con un adyuvante, preferentemente con Al(OH)₃ (Alhydrogel).

40 9. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 8, en la que por lo menos un péptido consiste en 9 a 20 restos de aminoácidos, especialmente 9 a 15 restos de aminoácidos.

45 10. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 9, en la que por lo menos un péptido consiste en 10, 11, 12, 13, 14 o 15 restos de aminoácidos, preferentemente 13 o 14 restos de aminoácidos, especialmente 14 restos de aminoácidos.

50 11. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 10, que comprende por lo menos 2, por lo menos 3, o por lo menos 4 de dichos péptidos que consisten en 9 a 25 restos de aminoácidos.

55 12. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 11, que comprende el por lo menos un péptido en una cantidad de 0.1 ng a 10 mg, preferentemente de 0.5 a 500 µg, más preferentemente 1 a 100 µg.

60 13. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 12, en la que el péptido tiene una mayor inmunogenicidad, en comparación con el péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), de por lo menos 50%, preferentemente por lo menos 100%, especialmente por lo menos 200%, como se evidencia en un ELISA de suero.

65 14. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 13, en la que el péptido tiene una mayor capacidad para reducir los niveles de colesterol total, en comparación con el péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), de por lo menos 3%, preferentemente por lo menos 5%, especialmente por lo menos 10%, como se evidencia en un ensayo de colesterol sérico.

70 15. Vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 14, para uso en un método para tratar y/o prevenir trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular o insuficiencias venosas periféricas, o enfermedades neoplásicas, preferentemente melanoma y metástasis de cáncer de hígado ligados a PCSK9.

75 16. Péptido que consiste en 9 a 25 restos de aminoácidos, siendo dicho péptido una variante del péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1) con un aumento de la inmunogenicidad en mamíferos, especialmente seres humanos, en comparación con PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), y en el que dicha variante se

- 5 21. Péptido de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 16 a 20, en el que el péptido tiene un incremento de la inmunogenicidad, en comparación con el péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), de por lo menos 50%, preferentemente por lo menos 100%, especialmente por lo menos 200%, como se evidencia en un ELISA de suero.
- 10 22. Péptido de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 16 a 21 en el que el péptido tiene una mayor capacidad para reducir los niveles de colesterol total, en comparación con el péptido PEEDGTRFHRQASK (SEC ID nº 1), de por lo menos 3%, preferentemente por lo menos 5%, especialmente por lo menos 10%, como se evidencia en un ensayo de colesterol sérico.
- 15 23. Método para el tratamiento de pacientes que tienen un riesgo de desarrollar trastornos causados por hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 1 a 15.
- 20 24. Método de acuerdo con la forma de realización 23, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular o insuficiencias venosas periféricas.
- 25 25. Método de acuerdo con la forma de realización 23 o 24, en el que preferentemente por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica, o por vía intravenosa.
- 30 26. Método de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 23 a 25, en el que la vacuna administrada contiene por lo menos un péptido en una cantidad de 0.1 ng a 10 mg, preferentemente de 0.5 a 500 µg, especialmente 1 a 100 µg.
- 35 27. Método de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 23 a 26, en el que la vacuna se aplica entre 2 y 10, preferentemente entre 2 y 7, y muy preferentemente hasta 5 veces al paciente.
28. Método de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 23 a 27, en el que la vacuna se administra por lo menos dos veces, y en el que el intervalo de administración está entre 2 semanas y 5 años, preferentemente entre 1 mes y hasta 3 años, más preferentemente entre 2 meses y 1.5 años.
29. Método de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización 23 a 28, en el que la vacuna se administra durante 3 a 4 vacunaciones iniciales a lo largo de un periodo de 6 a 8 semanas y hasta 6 meses, seguido preferentemente de otras administraciones después de tales vacunas iniciales.

Listado de secuencias

- <110> Affiris AG
- 40 <120> Vacuna
- <130> R 67027
- 45 <150> EP 14157221.4
- <151> 2014-02-28
- <160> 46
- 50 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> Secuencia artificial, Mimotopo
- 60 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo de restos de aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en serina, treonina, valina y alanina
- 65 <220>
- <221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo de restos de aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo de isoleucina, valina, glicina, glutamina y alanina, más preferentemente isoleucina, valina, glutamina y alanina

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo de restos de aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en prolina, treonina, alanina y valina, más preferentemente prolina

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en asparagina, serina, alanina, glutamina y ácido aspártico

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en leucina, glicina, alanina, tirosina, ácido aspártico, fenilalanina y valina, preferentemente leucina

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo de resto de aminoácido cargado negativamente, hidrófilo, preferentemente un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo de restos de aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en isoleucina, leucina, alanina y treonina

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es un resto de aminoácido seleccionado de entre el grupo de restos de aminoácidos no cargados, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en treonina, leucina, glutamina, alanina y serina, o nada

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es X10X11X12 como se define en la solicitud de patente según se presentó, o un fragmento truncado C-terminal del mismos que consiste en 1 o 2 restos de aminoácidos, o nada

40

<400> 1

45

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

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> fragmento de PCSK9
 <400> 2

60

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

<220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

 <400> 8
 5 **Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Ala**
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 15
 <400> 9

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

 20 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

 <400> 10

 Pro Gln Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 30 1 5 10
 <210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

 <400> 11
 40
 Pro Lys Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo
 50
 <400> 12

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

 55 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

<400> 13

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

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

10 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 14

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

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

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, Mimotopo

25 <400> 15

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

30 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 16

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

40 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 17

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

50 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

60 <400> 18

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

5 <210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

10 <400> 19

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

15 <210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 20

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Thr Lys
 25 1 5 10

30 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

35 <400> 21

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

40 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

45 <400> 22

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Leu Lys
 50 1 5 10

55 <210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

60 <400> 23

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

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

 10 <400> 24

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

 <210> 25
 15 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia artificial, mimotopo

 <400> 25

 Lys Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 1 5 10
 25
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

 <400> 26
 35
 Pro Glu Trp Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 1 5 10

 <210> 27
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo
 45
 <400> 27

 Pro Glu Glu Asp Lys Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 1 5 10
 50
 <210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

 <400> 28

 Pro Glu Glu Asp Gly Thr Gly Phe His Arg Gln Ala Ser Lys
 1 5 10
 60
 <210> 29

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

5 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

20 <400> 30

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

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

30 <400> 31

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

35 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

45 <400> 32

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

<210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

55 <400> 33

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

60 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, mimotopo

5 <400> 34

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

10 <210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 35

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

20 <210> 36
 <211> 14
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, mimotopo

30 <400> 36

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

35 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 37

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

45 <210> 38
 <211> 14
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 14
 <212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

15 <400> 40

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

20 <210> 41
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 41

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

<210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

40 <400> 42

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

45 <210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 44

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

5

<210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia artificial, mimotopo

<400> 45

15

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

<210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> péptido inmunógeno genérico

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(14)

<400> 46

Xaa Xaa Glu Asp Gly Xaa Arg Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende por lo menos un péptido, seleccionado de entre el grupo que consiste en PEEDGTRFHRRASK, PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRTASK, PEEDGSRFHKQASK y PEEDGSRFHRQATK.
- 10 2. Vacuna que comprende por lo menos un péptido, seleccionado de entre el grupo que consiste en PEEDGTRFHRRASK, PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRTASK, PEEDGSRFHKQASK y PEEDGSRFHRQATK para una utilización en la reducción de los niveles de colesterol de LDL en plasma.
- 15 3. Vacuna según la reivindicación 1 o para una utilización según la reivindicación 2, en la que dicho por lo menos un péptido está acoplado o fusionado con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. Vacuna según la reivindicación 1 o 3, o para una utilización según la reivindicación 2 o 3, en la que por lo menos un péptido comprende en su extremo N y/o C, por lo menos un resto de cisteína unido directamente o a través de una secuencia espaciadora al mismo.
- 25 5. Vacuna según la reivindicación 3 o 4, o para una utilización según la reivindicación 3 o 4, en la que el portador farmacéuticamente aceptable es un portador proteínico.
- 30 6. Vacuna según la reivindicación 5, o para una utilización según la reivindicación 5, en la que el portador proteínico se selecciona de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetánico (TT), CRM197, proteína D, o una toxina de la difteria (DT), preferentemente una toxina de la difteria mutada, CRM197, o KLH, especialmente KLH.
- 35 7. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, o para una utilización según las reivindicaciones 2 a 6, en la que la vacuna se formula con un adyuvante, preferentemente con Al(OH)₃ (Alhydrogel).
- 40 8. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7, para una utilización en un método para tratar y/o prevenir hiperlipidemia, hipercolesterolemia, aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular o enfermedades vasculares periféricas, enfermedad oclusiva arterial periférica, cardiopatía coronaria, ataque cerebral apopléjico; o enfermedades neoplásicas, preferentemente melanoma y metástasis de cáncer de hígado ligadas a PCSK9.
- 45 9. Péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en PEEDGTRFHRRASK, PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRTASK, PEEDGSRFHKQASK y PEEDGSRFHRQATK.
10. Péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en PEEDGTRFHRRASK, PEEDGTRFHRKASK, PEEDGTRFHRTASK, PEEDGSRFHKQASK y PEEDGSRFHRQATK para una utilización en la reducción de los niveles de colesterol de LDL en plasma.
11. Péptido según la reivindicación 9, para una utilización para el tratamiento de pacientes que presentan o presentan un riesgo de desarrollar hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o aterosclerosis, preferentemente enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular o enfermedades vasculares periféricas, enfermedad oclusiva arterial periférica, cardiopatía coronaria, ataque cerebral apopléjico; o enfermedades neoplásicas, preferentemente melanoma y metástasis de cáncer de hígado ligadas a PCSK9.

Figura 1A

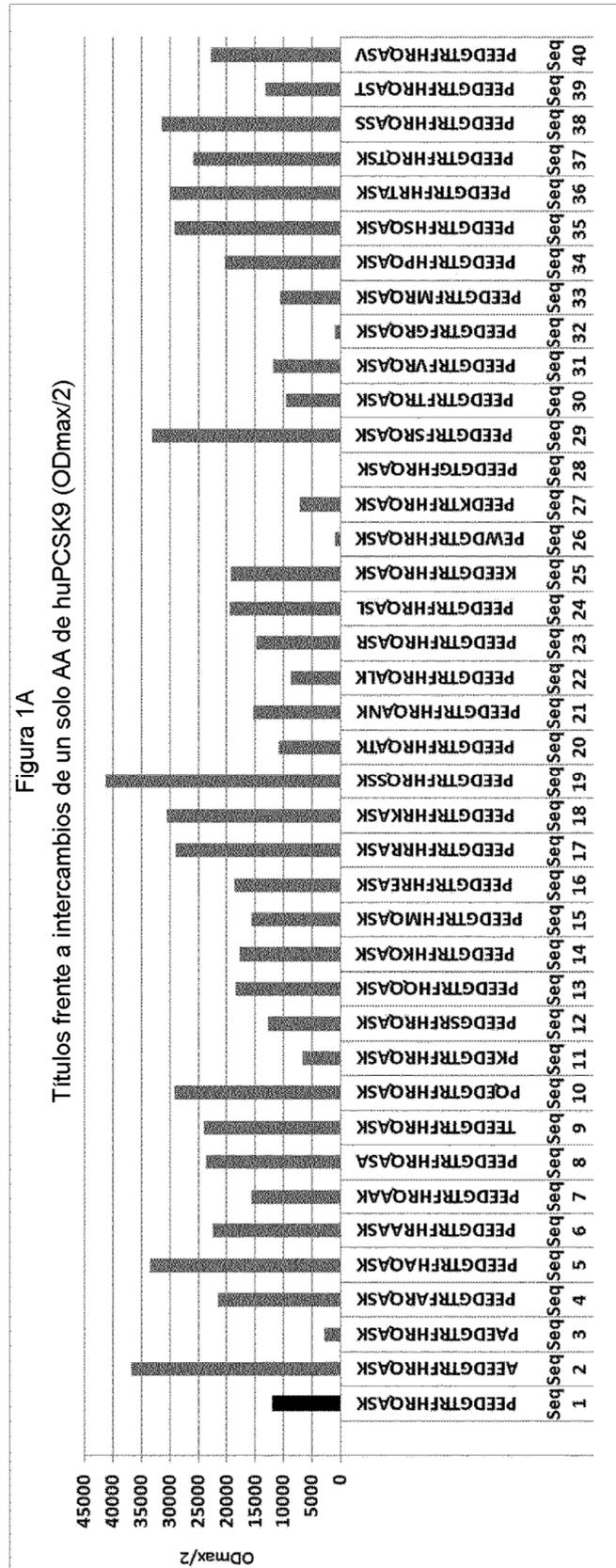


Figura 1B

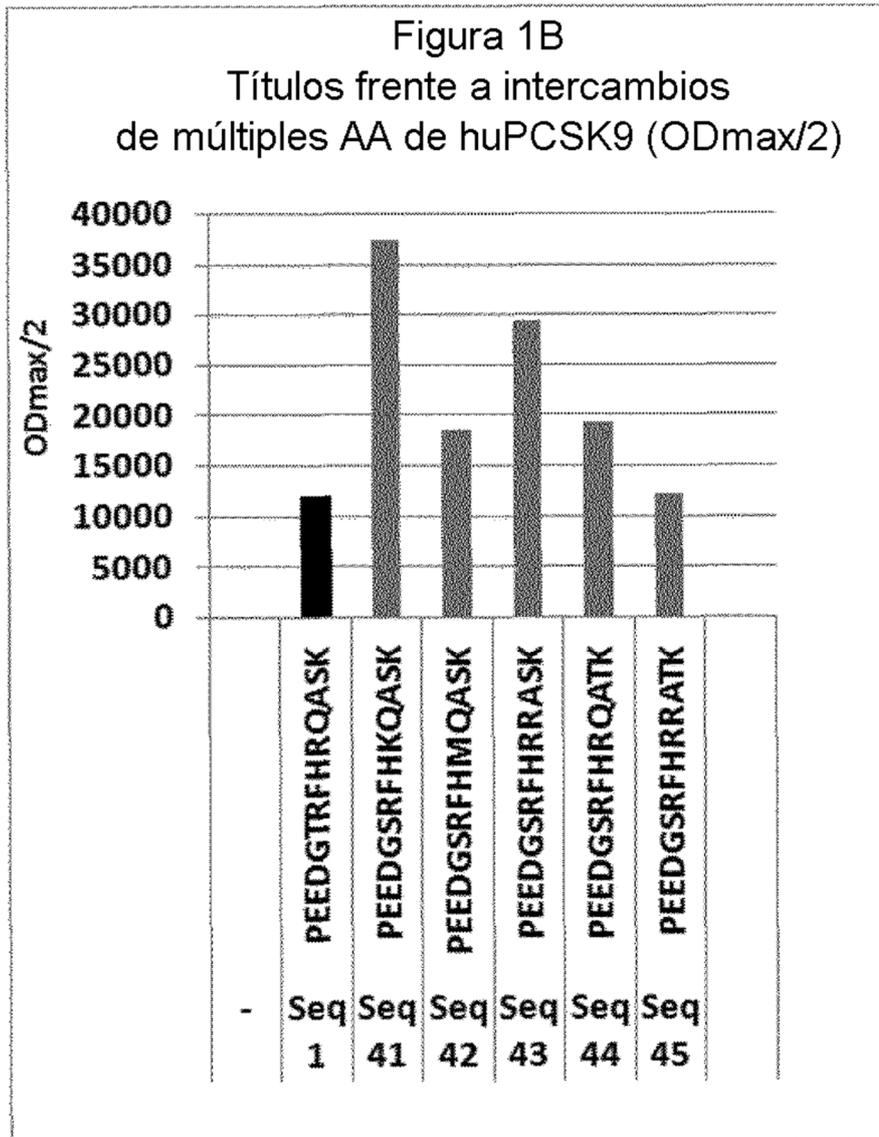


Figura 2A

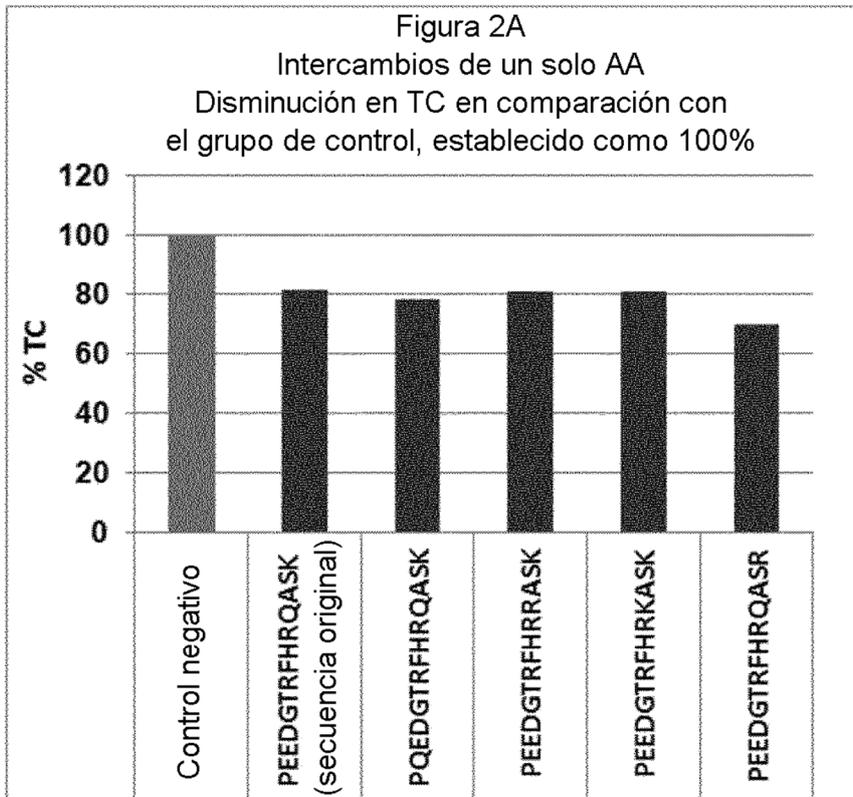


Figura 2B

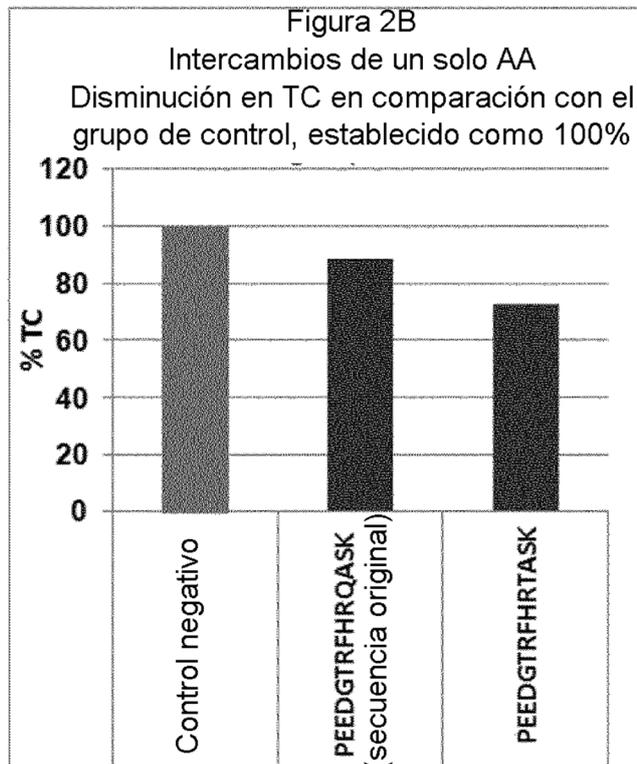


Figura 2C

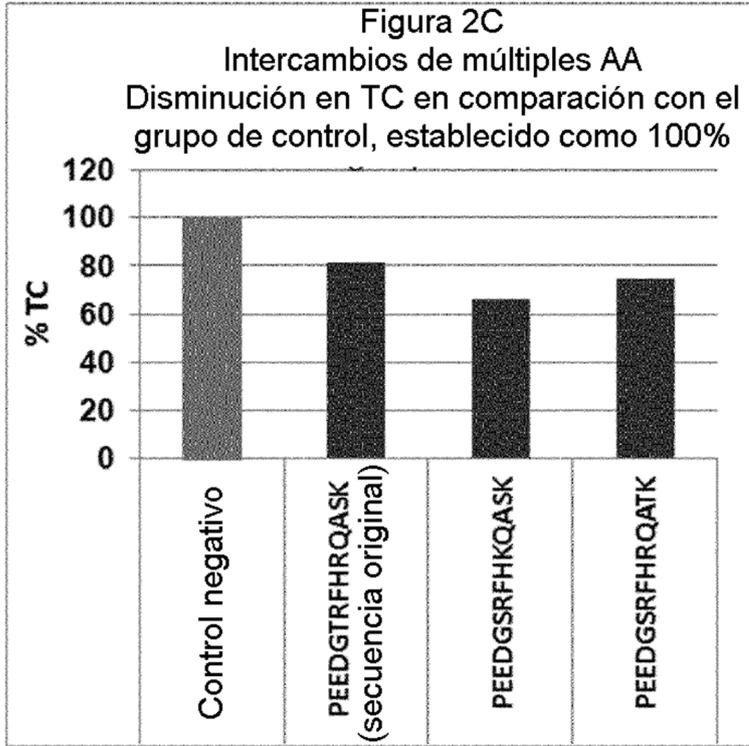


Figura 3

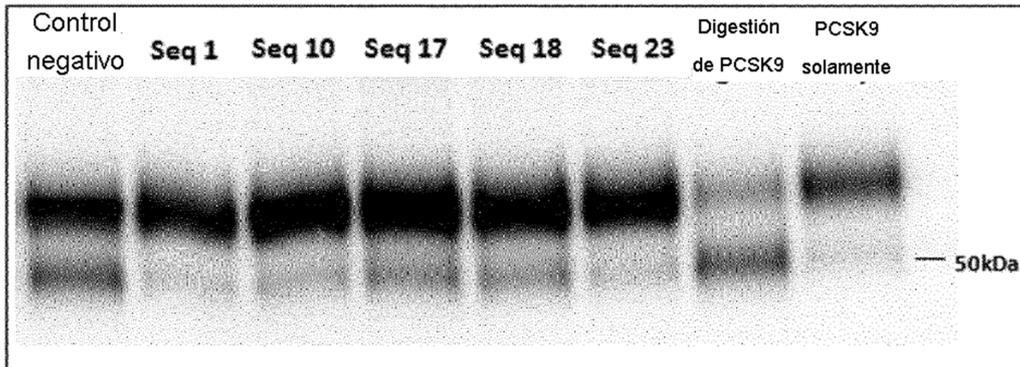


Figura 4

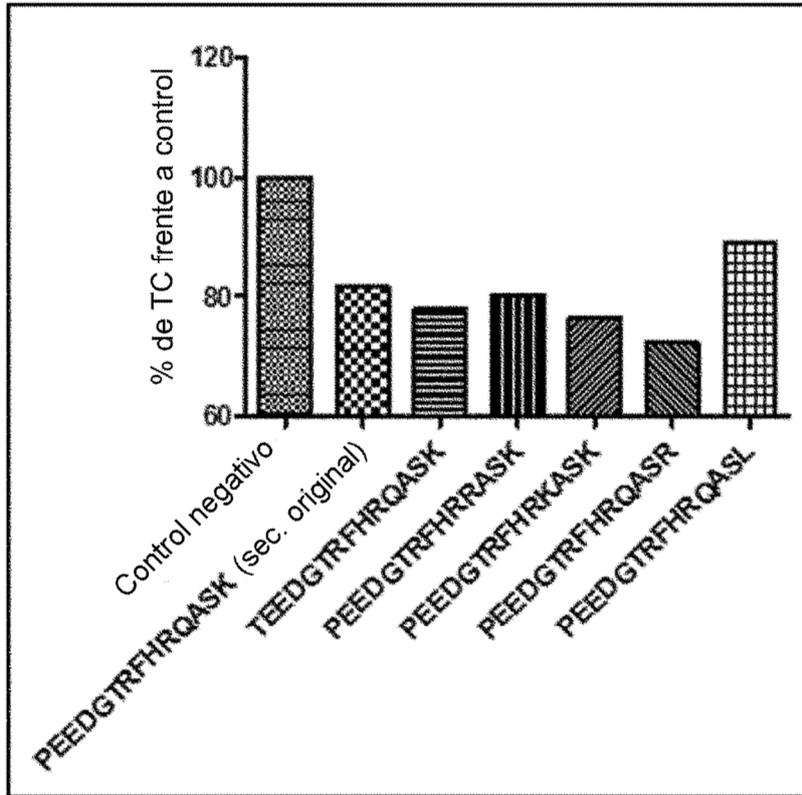


Figura 5

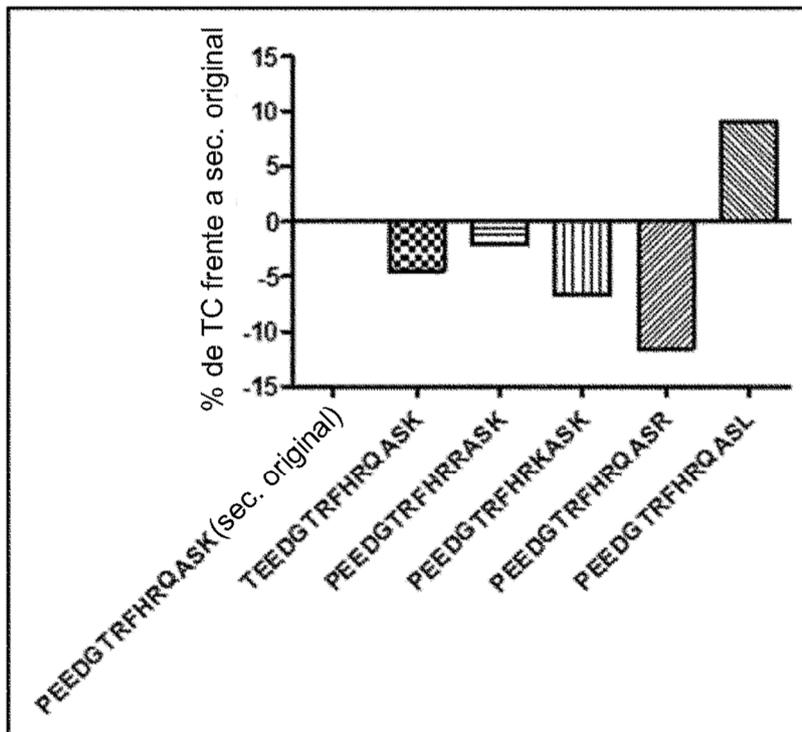


Figura 6

