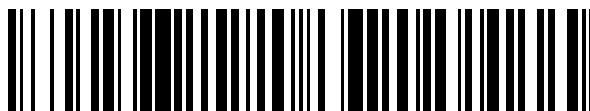


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 632**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011** **PCT/EP2011/073599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012** **WO12085090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011** **E 11802093 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019** **EP 2654778**

54 Título: **Vacunas a base de péptidos de la proteína C5a de complemento**

30 Prioridad:

21.12.2010 EP 10196232

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

STAFFLER, GÜNTHER;
LANDLINGER, CHRISTINE y
MATTNER, FRANK

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 718 632 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 a base de péptidos de la proteína C5a de complemento.

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

10 El complemento es un componente central del sistema inmunitario innato, que actúa para proteger al hospedante de microorganismos tales como virus, bacterias, y otras células anormales y extrañas. Sin embargo, la activación inapropiada o excesiva del sistema del complemento puede conducir a capacidades destructivas contra el mismo hospedante. La activación descontrolada del complemento está implicada en diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington; en enfermedades inflamatorias crónicas, que incluyen degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome antifosfolípido (APS), asma, vasculitis, aterosclerosis, esclerosis múltiples, dermatitis inflamatoria, tal como psoriasis y urticaria crónica, síndrome Guillain-Barre, y síndrome urémico hemolítico.

20 La activación descontrolada del complemento también puede presentar cáncer, en complicaciones del embarazo, tales como preeclampsia, y APS, bajo condiciones patológicas agudas, incluyendo septicemia, daño pulmonar agudo, síndrome disneico agudo (ARDS), lesión por isquemia-reperfusión, y en superficies artificiales que conduce trombosis asociada a hemodiálisis.

25 Muchos de los efectos tóxicos observados en estas condiciones son atribuibles a la producción excesiva de la anafilatoxina C5a, que promueve y perpetúa reacciones inflamatorias. La principal función de C5a es la quimiotaxia y activación de granulocitos, mastocitos, y macrófagos, para liberar mediadores inmunitarios solubles. La inhibición o modulación de la actividad del complemento, por lo tanto, se ha reconocido como una estrategia terapéutica prometedora durante muchos años.

30 La mayoría de las proteínas de complemento existen en el plasma como precursores inactivos que se escinden y activan entre sí en una cascada proteolítica en respuesta a tres mecanismos diferentes: la ruta clásica, la inducida por lectinas, y la ruta alternativa. El resultado final de las tres cascadas de activación es la amplificación masiva de la respuesta y la formación de las anafilatoxinas C3a y C5a, y el complejo de ataque a membrana (MAC) que destruye células, un poro que provoca lisis de las células.

35 La ruta clásica se activa principalmente por complejos de antígeno-anticuerpo. Cuando la proteína C1 macromolecular intacta se une a las regiones expuestas de por lo menos dos anticuerpos unidos al antígeno, las subunidades C1r y C1s se activan. La C1r activada es responsable de la escisión de los siguientes dos componentes del complemento implicados, C4 y C2. C4 se escinde en dos fragmentos. La molécula de C4b más grande se une a la membrana diana próxima, mientras que la molécula C4a pequeña flota alejándose. De nuevo, la C1s activada escinde la molécula C2, produciendo C2b y C2a, con lo cual se libera esta última. La que permanece unida a la membrana es C4b2a, también conocida como la C3 convertasa, que convierte el siguiente componente del complemento, C3, en su forma activa. La C3 convertasa divide múltiples C3 en el fragmento C3b más grande y el fragmento C3a más pequeño. La C5 convertasa se forma entonces por ensamblaje del complejo heterotrimérico, C4b2a3b, que cataliza la escisión de cientos de miles de componentes C5 del complemento en C5a y C5b antes de que vuelva a la inactividad. La C5a flota alejándose, y contribuye a la inflamación, mientras que el fragmento C5b se une a la superficie del antígeno, iniciando la formación del complejo de ataque a membrana (MAC).

50 La segunda ruta de activación del complemento es la ruta de unión a lectina. Esta ruta se activa uniendo lectina que se une a manosa (MBL) o ficolinas a restos de manosa en la superficie del patógeno, lo cual activa las serina proteasas asociadas a MBL, MASP-1, y MASP-2. Las MASP pueden dividir entonces C4 en C4a y C4b, y C2 en C2a y C2b, conduciendo a la formación de las C3 y C5 convertasas de la ruta clásica.

55 La ruta alternativa se inicia directamente por moléculas de superficie que contienen hidratos de carbono y lípidos de patógenos. El componente C3 del complemento se escinde espontáneamente en niveles bajos. El componente C3b puede unirse a un número de superficies diferentes, tanto de células hospedantes como extrañas similares. C3b es inactivado rápidamente por el ácido siálico encontrado en la mayoría de las superficies de las células de los mamíferos. Los microbios, la mayoría de los cuales carecen de ácido siálico, son sitios estables para la deposición de C3b. Los fragmentos de C3b unidos a la membrana se unen mediante el Factor B, el cual, a su vez, es escindido por el Factor D. El fragmento Ba se libera, mientras que Bb permanece asociado con C3b. La molécula C3bBb resultante es la C3 convertasa de la ruta alternativa. La molécula C3b permanece unida para formar la C5 convertasa de la ruta alternativa, C3bBb3b. Esta enzima escinde C5 en C5a y C5b. La molécula C5b permanece asociada con la membrana, y se asocia con C6 a través de C9 para formar el MAC, mientras C5a actúa como anafilatoxina.

El componente C5 del complemento es una proteína de 190 kDa, y comprende dos cadenas (α 115 kDa y β 75 kDa). La activación de cualquiera de las rutas del complemento puede generar una enzima C5 convertasa apta para escindir C5 en C5b y la potente anafilatoxina C5a. Con la escisión de C5, se forma un neoepítipo C-terminal en el fragmento C5a.

El C5a humano es una glicoproteína de 74 aminoácidos con el peso molecular de 12-14.5 kDa. Se encuentra una asparagina situada en la posición 64, que presenta un resto de hidrato de carbono enlazado mediante N que no es esencial para la actividad biológica pero que regula muy probablemente la actividad de C5a *in vivo*. La espectroscopía de RMN mostró un haz de cuatro hélices antiparalelas, estabilizándose los cuatro segmentos helicoidales diferentes mediante tres enlaces de disulfuro y conectados a segmentos del bucle. En el extremo N, también está presente una hélice corta de 1.5 vueltas. C5a se une a dos receptores de siete dominios transmembránicos, C5aR (CD88) y C5L2 (gpr77), que están expresados de forma ubicua en una amplia variedad de células, pero particularmente en la superficie de células inmunitarias como macrófagos, neutrófilos, mastocitos, y linfocitos T. El sitio de C5aR de unión al ligando es complejo, y consiste en por lo menos dos dominios de unión separables físicamente. Uno se une al núcleo enlazado a disulfuro de C5a (aminoácidos 15-46), mientras que el segundo se une al extremo carboxi terminal de C5a (aminoácidos 67-74). La afinidad de unión de C5aR a su ligando C5a es muy elevada, indicando una constante de disociación (K_D) de alrededor de 1 nM. Sin embargo, C5a es metabolizado rápidamente por el suero y por carboxipeptidasas de la superficie celular hasta una forma de 73 aminoácidos, C5a desArg, con lo que la afinidad de unión a C5aR disminuye 10 a 100 veces.

Se desarrollaron anticuerpos policlonales de conejo frente a tres regiones peptídicas de C5a de rata, los restos 1-16 de la región N-terminal, los restos 17-36 de la región media, y los restos 58-77 de la región C-terminal, mientras que los anticuerpos anti-C-terminal mostraron el mejor efecto protector en septicemia experimental en ratas (Huber-Lang, Sarma et al. 2001, FABSEB J 15(3): 568-70).

Además, se ha descrito un anticuerpo monoclonal frente al neoepítipo C-terminal de C5a porcino (posición 57-74), que neutraliza la bioactividad de C5a porcino (Hopken, Mohr et al. 1996, Eur J Immunol 26 (5): 1103-9). El papel central del complemento en la patofisiología de enfermedades importantes lo hace una diana interesante para la industria farmacéutica. Se han desarrollado numerosos enfoques para la sustitución, inhibición o modulación clínicas del complemento. Sin embargo, el único fármaco específico del complemento aprobado por la FDA hasta ahora es SOLIRIS® (Eculizumab) para la indicación de hemoglobulinuria nocturna paroxísmica (PNH). Este anticuerpo monoclonal se dirige contra la proteína C5 del complemento, evitando la generación de productos de escisión C5a y C5b.

Se han generado y sugerido otros anticuerpos monoclonales, que se unen a C5 y bloquean la separación en C5a y C5b, para uso en la terapia de enfermedades que implican daño tisular derivado de la activación descontrolada del sistema del complemento (documentos WO 95/29697, WO 2004/022096, US 2006/0115676, EP 1 878 441). Un anticuerpo que se une a C5 y a C5a, pero que no evita la activación de C5b, es el anticuerpo MAb137-26 (patente US nº 7.432.356). Se han investigado anticuerpos, que se unen específicamente al producto de escisión C5a, para tratar el síndrome disneico del adulto (ARDS) (documento WO 86/05692) y la activación lesiva del complemento intravascular (documento EP 0 245 993). Además, se ha propuesto el uso de un anticuerpo monoclonal que es reactivo contra el receptor de C5a (C5aR), y de ese modo reduce o inhibe presumiblemente la unión de C5a a C5aR, en el tratamiento de trastornos inmunopatológicos (documentos WO 2003/062278, NZ 538384, JP 8109200). Recientemente se ha publicado (documento WO 2009/103113) el uso como agente terapéutico y de diagnóstico de un anticuerpo humanizado anti-C5aR, que se une al receptor de C5a humano.

Las estrategias de inmunización pasiva que usan anticuerpos monoclonales se enfrentan a diferentes limitaciones, incluyendo costes elevados para la producción de anticuerpos, y el desarrollo de respuestas inmunitarias neutralizantes frente a los anticuerpos terapéuticos (anticuerpos antifármacos) con la aplicación repetida de los anticuerpos.

La aplicación de anticuerpos terapéuticos que evitan la escisión de C5 en C5a y C5b puede conducir a infecciones recurrentes, puesto que se evita la producción del fragmento C5b (el componente de semilla para el MAC), que es importante para la lisis de las bacterias. Además, las estrategias inmunoterapéuticas dirigidas que seleccionan como diana un epítipo accesible en C5 y C5a, pero que no evitan la escisión de la molécula C5, son desventajosas puesto que los compuestos farmacéuticos activos (anticuerpos monoclonales) o los anticuerpos específicos de la diana inducidos no distinguen entre la forma activa e inactiva de C5. Serán necesarias concentraciones muy elevadas de anticuerpo en el suero para asegurar que se neutralizará una parte importante de C5a activo. La concentración normal de proteína C5 en el suero es de aproximadamente 75 μ g/ml, mientras que C5a actúa a concentraciones de 10 a 100 ng/ml.

Kim et al. (Cancer Immunol. Immunother 54 (2005): 1026-1037) describen la regresión tumoral mediante interferencia con el ciclo celular tras la expresión de C5a en un modelo de cáncer mamario de vacuna. Nandakumar et al. (PLOS one 5 (10) (2010): e13511) describen la prevención de la artritis usando una vacuna de C5a recombinado.

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

La presente invención se refiere a una vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos ANISHKDMQLGR (SEC ID n°: 3), NISHKDMQLGR (SEC ID n°: 4), SHKDMQLGR (SEC ID n°: 6), y KDMQLGR (SEC ID n°: 7), que se acopla o fusiona a una proteína portadora que comprende por lo menos un epítipo de linfocitos T, para uso en el tratamiento de un trastorno mediado por el complemento, en el que el trastorno mediado por el complemento se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), artritis reumatoide (RA), síndrome antifosfolípido, asma, y aterosclerosis.

Parece que el péptido LRANISHKDMQLGR (SEC ID n°: 1), que corresponde a los restos de aminoácidos 61 a 74 de C5a humano, o un fragmento de dicho péptido, resulta apto para inducir la formación *in vivo* de anticuerpos específicos de C5a en un mamífero, en particular en un individuo humano. Además, los fragmentos de dicha secuencia que presentan un resto de histidina en el extremo N, por ejemplo HKDMQLGR (SEC ID n°: 16) y HKDMQLG (SEC ID n°: 22), no forman parte de la invención.

La vacuna según la presente invención, que puede comprender, (por lo menos) uno de los péptidos mencionados anteriormente, permite la inmunización activa de un mamífero, en particular un individuo humano, en la que los anticuerpos neutralizantes contra la proteína humana del complemento C5a son inducidos mediante vacunación con fragmentos derivados de C5a C-terminal cuando se acoplan o fusionan a un péptido o polipéptido o a una proteína portadora (como una molécula que comprende el epítipo de linfocitos T). La combinación péptido/portador es importante, puesto que los péptidos de la presente invención no tienen la capacidad para inducir cantidades relevantes de anticuerpos cuando se inyectan sin acoplarlos a un portador. De este modo, la presente invención de una inmunización activa frente a hC5a ofrece ventajas con respecto al empleo de la terapia de anticuerpos monoclonales para tratar enfermedades basadas en C5a. Por lo tanto, se eluden los problemas de la terapia con anticuerpos monoclonales anti-C5a, incluyendo la necesidad de infusiones repetidas de grandes cantidades de anticuerpo, visitas frecuentes de los pacientes al hospital, y coste elevado de producción de anticuerpos humanizados.

En el documento WO 2006/134125 se describe una inmunización activa frente a hC5a mediante el uso de un fragmento de hC5a C-terminal de 20-mero (posiciones 55-74 de hC5a, identificada en la presente memoria como SEC ID n°: 14) enlazado a una partícula similar a un virus (VLP). Los compuestos de la presente invención (Tabla 1), sin embargo, proporcionan péptidos derivados de hC5a C-terminal que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria claramente superior frente al C5a humano cuando se compara con SEC ID n°: 14 (Tabla 2) (ver las figuras 2 y 3). Además, los compuestos de la presente invención inducen anticuerpos que muestran una mayor actividad funcional en un ensayo a base de células, así como en un modelo *in vivo*, cuando se comparan con SEC ID n°: 14 (Tabla 1) (ver las figuras 4, 5, y 6).

La inmunización de un mamífero con un compuesto según la presente invención, que comprende la secuencia de aminoácidos KDMQLGR (SEC ID n°: 7), da como resultado una respuesta inmunitaria mucho mayor que la inmunización con el fragmento de hC5a C-terminal de 20-mero mencionado anteriormente. Además, la inmunización de un mamífero con la parte N-terminal de dicho 20-mero que consiste en la secuencia de aminoácidos CVVASQLRAN (SEC ID n°: 24) no dio sorprendentemente como resultado la formación *in vivo* de anticuerpos específicos contra C5a (ver la figura 1). Esto muestra claramente que no todos los fragmentos del fragmento de hC5a C-terminal de 20-mero son capaces de inducir anticuerpos específicos contra C5a.

Por tanto, la vacunación con los fragmentos derivados de hC5a C-terminal, que presentan de 14 a 7 restos de aminoácidos como se presenta en la Tabla 1, alivia los trastornos mediados por el complemento, tales como enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, en los que C5a desempeña un papel crucial. Debido a la unión específica de los anticuerpos inducidos por el péptido a los epítopos C-terminales de C5a, las moléculas de C5a se neutralizarán en el mamífero, y se bloqueará la unión de C5a a su receptor (C5aR).

Además, este enfoque no interfiere con la generación y función del fragmento de C5b, que desempeña un papel importante en la defensa del hospedante, debido a que los anticuerpos inducidos no reconocen toda la proteína C5, sino solamente el neoepítipo en el producto de escisión C5a.

Se ha mostrado que los 6-8 restos C-terminales de C5a solos presentan la capacidad de unirse al receptor de C5a, y de forma más importante, actuar como agonista. Además, se ha publicado un gran número de análogos C-terminales de alta afinidad de la anafilatoxina C5a que exhiben un efecto antagonista frente al receptor de C5a (patentes US n° 6.821.950; US n° 6.465.614; US n° 5.807.824; documento US 2009/0117171). Contrariamente a estos enfoques, en los que los péptidos solos (sin otros componentes) se han aplicado para bloquear o activar el C5aR por sí mismos, en la presente invención los péptidos se acoplan a una proteína portadora (o a un péptido que contiene un epítipo de célula T) antes de la administración, a fin de inducir la formación de anticuerpos específicos contra la proteína C5a del complemento.

Los compuestos/péptidos descritos en la presente memoria están compuestos por 14 a 7 restos de aminoácidos, ya sea con o sin arginina en la última posición (Tabla 1: SEC ID nº 1-13). Los péptidos con el resto de aminoácido histidina en el extremo N se excluyeron de las secuencias que se van a reivindicar, debido a que estos péptidos (SEC ID nº: 16 y SEC ID nº: 22) no inducen anticuerpos funcionalmente activos contra hC5a (ver las figuras 4 y 5). La longitud mínima del péptido para inducir una respuesta inmunitaria específica y/o anticuerpos funcionalmente activos contra C5a es de 7 restos de aminoácidos (figuras 2, 3, 4, y 5).

El compuesto/péptido de la presente invención se puede producir de forma sintética por métodos de síntesis química que son bien conocidos en la técnica, ya sea como un péptido aislado o como una parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente, el compuesto/péptido se puede producir en un microorganismo, tal como bacteria, levadura u hongo, en células eucariotas tales como una célula de mamífero o de insecto, o en un vector vírico recombinante, tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus del bosque de Simliki, baculovirus, bacteriófago, virus sindbis, o virus sendai, que producen el compuesto/péptido el cual se aísla entonces y, si se desea, se purifica posteriormente. Las bacterias adecuadas para producir el compuesto/péptido incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar péptidos. Los tipos adecuados de levaduras para expresar dicho compuesto/péptido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida spp.*, *Pichia pastoris*, o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los métodos correspondientes son bien conocidos en la técnica. También son bien conocidos en la técnica los métodos para aislar y purificar péptidos producidos recombinantemente, e incluyen, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.

Para facilitar el aislamiento del compuesto/péptido, se puede generar un polipéptido de fusión, en el que el compuesto/péptido se fusiona traduccionalmente (enlazado covalentemente) a un polipéptido heterólogo que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Los polipéptidos heterólogos típicos son etiqueta de His (por ejemplo, His6; 6 restos de histidina), etiqueta de GST (glutathione-S-transferasa), etc. El polipéptido de fusión facilita no solo la purificación del compuesto/péptido, sino también puede evitar la degradación de dicho compuesto/péptido durante la purificación. Si se desea eliminar el polipéptido heterólogo tras la purificación, el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de escisión en la unión entre el compuesto/péptido y el polipéptido heterólogo. El sitio de escisión consiste en una secuencia de aminoácidos que se escinde con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio (por ejemplo proteasas).

Se describen en la presente memoria los fragmentos peptídicos RANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 2), ANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 3), NISHKDMQLGR (SEC ID nº: 4), ISHKDMQLGR (SEC ID nº: 5), SHKDMQLGR (SEC ID nº: 6), KDMQLGR (SEC ID nº: 7), LRANISHKDMQLG (SEC ID nº: 8), RANISHKDMQLG (SEC ID nº: 9), ANISHKDMQLG (SEC ID nº: 10), NISHKDMQLG (SEC ID nº: 11), ISHKDMQLG (SEC ID nº: 12) y SHKDMQLG (SEC ID nº: 13). Según la presente invención, el fragmento peptídico se selecciona de entre el grupo de ANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 3), NISHKDMQLGR (SEC ID nº: 4), SHKDMQLGR (SEC ID nº: 6), y KDMQLGR (SEC ID nº: 7).

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos LRANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 1), o un fragmento peptídico del mismo, puede comprender en su extremo N y/o C por lo menos un resto de cisteína unido directamente o vía una secuencia espaciadora a él.

El resto de cisteína puede servir como un grupo reactivo, a fin de unir el péptido a otra molécula o a un portador. Por ejemplo, este grupo se puede usar para unir el péptido a una proteína portadora. El resto de cisteína se puede unir directamente a los péptidos de la presente invención, o vía 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 óptimamente un máximo de diez, preferentemente un mínimo de cinco restos de aminoácidos no polares pequeños, tales como glicinas.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el portador se selecciona de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetánico (TT), toxina de la difteria (DT), o cualquier otra proteína o péptido que contenga epítopos de célula T.

Según la presente invención, el péptido se acopla o fusiona a un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente KLH (hemocianina de lapa californiana), toxoide tetánico, proteína de unión a albúmina, seroalbúmina bovina, un dendrímero (MAP; Biol. Chem. 358: 581), enlazadores peptídicos (o regiones de flaqueo), así como a las sustancias adyuvantes descritas en Singh et al. (Singh et al. 1999, Nat. Biotech. 17: 1075-1081 (en particular aquellas en la Tabla 1 de ese documento)), y O'Hagan et al. (O'Hagan y Valiante, 2003, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9): 727-735 (en particular los compuestos endógenos inmunopotenciadores y sistemas de suministro descritos allí)), o mezclas de los mismos. Se puede usar la química de conjugación (por ejemplo vía compuestos heterobifuncionales tales como GMBS, y por supuesto también otros, como se describe en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson) en estas partículas similares, enterotoxina lábil al calor (LT), toxina del cólera (CT), toxinas mutantes (por ejemplo LTK63 y LTR72), micropartículas, y/o liposomas polimerizados.

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

- 5 La vacuna de la presente invención se puede administrar subcutáneamente, intramuscularmente, intradérmicamente, intravenosamente (ver, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc, 2004). Dependiendo de la vía de administración, el medicamento puede comprender vehículos, adyuvantes, y/o excipientes respectivos.
- 10 La vacuna según la presente invención puede contener el compuesto según la invención en una cantidad 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. El compuesto o péptido de la presente invención se puede administrar a un mamífero en una cantidad de preferentemente 100 ng a 1 mg, más preferentemente 1 µg a 500 µg, incluso más preferentemente 10 µg a 100 µg, en particular 20 a 40 o 30 µg, por dosis. Típicamente, la vacuna también puede contener sustancias auxiliares, por ejemplo amortiguadores, estabilizantes, etc. La vacuna según la presente invención se puede aplicar 3 a 6 veces en un intervalo de tiempo de dos semanas hasta 2 meses. Con las vacunas anti-C5a existentes, la vacuna se aplica a intervalos regulares de aproximadamente 6 meses.
- 20 Según la presente invención, la vacuna se usa en el tratamiento de un trastorno mediado por el complemento, en el que el trastorno mediado por el complemento se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (AMD), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, asma (alérgico), aterosclerosis, artritis reumatoide, y síndrome antifosfolípido.
- 25 de un trastorno mediado por el complemento administrando una vacuna según la presente invención.

El trastorno mediado por el complemento puede comprender una enfermedad inflamatoria, preferentemente una enfermedad inflamatoria crónica.
- 30 Una enfermedad inflamatoria puede comprender degeneración macular relacionada con la edad (AMD), un trastorno neurodegenerativo, preferentemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington, asma alérgica, aterosclerosis, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis, dermatitis inflamatoria, preferentemente psoriasis y urticaria, artritis reumatoide, síndrome antifosfolípido (APS), esclerosis múltiple, síndrome urémico hemolítico, y lupus eritematoso sistémico (SLE).
- 35 El trastorno mediado por el complemento puede incluir lesión por isquemia-reperfusión, lesión pulmonar aguda, síndrome disneico agudo (ARDS), septicemia, cáncer, complicaciones del embarazo tales como preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes, retraso del crecimiento intrauterino, y APS.
- 40 Un trastorno mediado por el complemento también incluye un trastorno que implica actividad indeseable o inapropiada del complemento, tal como trombosis asociada a hemodiálisis. Esta actividad se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica. Los trastornos que se pueden tratar con la vacuna según la presente invención se caracterizan por una actividad de C5a incrementada.
- 45 La AMD es una afección médica que afecta habitualmente a personas mayores, y da como resultado una pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula) debido al daño a la retina. Se produce en formas "seca" y "húmeda", mientras que la forma seca da cuenta del 90% de todos los casos de AMD. Una de las señales clínicas más tempranas de AMD húmeda y seca es la aparición de depósitos lipoproteinosos amorfos que se acumulan extracelularmente en áreas próximas al epitelio del pigmento retiniano. Estos componentes patógenos se denominan drusas. Estudios recientes han implicado a la inflamación local y activación de la cascada del complemento en la formación de las drusas, la señal distintiva de AMD seca. Esto está en línea con otros estudios que muestran que, además de otras moléculas, el componente C5 del complemento se acumula en estas drusas.
- 50
- 55 Además, se ha mostrado que C5a, aparte de VEGF (C5a está implicado en la liberación de VEGF), desempeña un papel clave en la inducción de la neovascularización coroidal, que tiene lugar en la forma húmeda de AMD. Lo más importante, se puede mostrar que los anticuerpos neutralizantes contra C5a son capaces de detener la progresión de la enfermedad en modelos de animales.
- 60 Considerados juntos, existe un fuerte respaldo para la enfermedad mediada por el complemento en las formas húmeda y seca de AMD, y de este modo, C5a parece ser una diana óptima para el tratamiento de ambas formas de AMD.
- 65 Se propone que la inflamación mediada por el complemento, causada predominantemente por C5a, desempeña un papel en la aceleración o progresión de la enfermedad de Alzheimer. La activación prolongada del

complemento es disparada por placas de A β fibrilares en el cerebro con enfermedad de Alzheimer, y muchas manifestaciones de la enfermedad pueden ser contribuidas a glías reclutados y activados por C5a que promueven sucesos inflamatorios. Se pueden aplicar sucesos similares a la enfermedad de Parkinson y a la enfermedad de Huntington. Además, los datos preliminares indican un papel patógeno específico para el fragmento de activación del complemento C5 (C5a) en enfermedad de las neuronas motoras, un grupo de trastornos degenerativos que provocan muerte progresiva de las neuronas motoras, que conduce a parálisis y muerte eventuales.

El bloqueo de C5aR reduce claramente la inflamación de las vías respiratorias y la hipersensibilidad de las vías respiratorias en asma alérgica experimental. Sin embargo, el papel del componente C5 del complemento en el asma sigue siendo controvertido. Se ha descrito que C5 promueve o protege frente a la hipersensibilidad de las vías respiratorias en asma alérgica experimental, sugiriendo un papel dual para C5a en asma alérgica. Una hipótesis es que la señalización de C5aR durante la sensibilización por el alérgeno protege del desarrollo de alergia pulmonar, pero potencia el fenotipo alérgico en un entorno pulmonar inflamado, durante la fase efectora. De este modo, el bloqueo de C5aR puede ser de beneficio terapéutico para el tratamiento del asma consolidado.

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

La vasculitis es un proceso inflamatorio de los vasos sanguíneos, caracterizada histopatológicamente por inflamación y necrosis fibrinoide de la pared de los vasos. El espectro clínico de esta forma de vasculitis es variable, oscilando desde la púrpura hasta la glomerulonefritis proliferativa grave, y se supone que los sistemas del complemento están implicados críticamente en estos procesos. Por ejemplo, C5a desempeña un papel importante en la vasculitis asociada a autoanticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos (ANCA), una enfermedad autoinmune sistémica relativamente poco común pero potencialmente mortal. La glomerulonefritis semilunar necrosante inducida por ANCA requiere la participación del complemento en su patogénesis. C5a y el C5aR neutrofílico pueden componer un bucle de amplificación para la activación neutrofílica mediada por ANCA. El C5aR puede proporcionar una nueva diana terapéutica para la glomerulonefritis semilunar necrosante inducida por ANCA.

La activación del complemento está implicada en la patogénesis de los cambios inflamatorios en dermatitis autoinmune, incluyendo pénfigo ampolloso (BP), psoriasis vulgar, y urticaria crónica. En el pénfigo, la activación del complemento por el anticuerpo del pénfigo en la epidermis parece ser la responsable del desarrollo de cambios inflamatorios característicos, denominados espongiosis eosinofílica. En las escamas psoriásicas, se encuentran niveles elevados de C5a, indicando que en esta enfermedad está implicada la activación del complemento. Se sabe que la psoriasis es una enfermedad mediada por linfocitos T; sin embargo, los neutrófilos y los mastocitos también pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad. Los linfocitos T y los neutrófilos son quimioatraídos por C5a; por lo tanto, C5a podría ser una diana terapéutica importante para el tratamiento de psoriasis.

La activación del complemento también contribuye a la enfermedad inflamatoria autoinmune, artritis reumatoide. Parece que la anafilatoxina C5a es el producto principal de la activación del complemento responsable del daño tisular en artritis reumatoide, aunque también es importante el depósito del complejo de ataque a membrana, así como la opsonización con fragmentos de C3b.

La función del complemento en la patogénesis del lupus eritematosos sistémico (SLE) sigue siendo controvertida. Por un lado, los componentes del complemento parecen mediar el daño tisular iniciado por autoanticuerpos. Por otro lado, el sistema del complemento parece tener rasgos protectores, puesto que las deficiencias hereditarias de algunos complementos están asociadas con un mayor riesgo de SLE. Es conocido que los pacientes con SLE tienen a menudo hipocomplementemia. Además, se demostró que la señalización de C5a/C5aR desempeña un papel importante en la patogénesis del lupus del sistema nervioso central al regular la integridad de la barrera hematoencefálica. El potencial de bloqueo de C5a/C5aR se destacó como una estrategia terapéutica prometedora en SLE.

Parece que la perfusión tisular (R) y no la isquemia (I) activa el complemento, y conduce a daño inducido por inflamación. A pesar de que la implicación exacta de la activación del complemento en la lesión por I/R no está todavía clara, varios estudios experimentales han indicado una conexión entre el complemento y la patogénesis de la lesión por I/R, y han sugerido la inhibición del complemento como una terapia potente. Por ejemplo, en el modelo murino de lesión miocárdica por I/R, una inhibición de C5 sistémica, 30 minutos antes de la perfusión, protegió significativamente a los ratones de la lesión miocárdica por I/R.

Se ha demostrado la activación del complemento en muchas formas de lesión pulmonar aguda. La concentración de C5a está incrementada en fluidos de lavado broncoalveolar (BALF) en lesión pulmonar aguda inducida por instilación de ácido, y la concentración de C5a también está elevada en pulmones transplantados en seres

humanos. C5a atrae neutrófilos al pulmón, y activa directamente neutrófilos, macrófagos, y células endoteliales. El papel protector de anticuerpos anti-C5a se asoció con una reducción drástica en los niveles de TNF- α de BALF, así como con una profunda disminución en la expresión de la molécula de adhesión intercelular vascular pulmonar ICAM-1, sugiriendo que C5a es esencial en la creación de las bases de la red inflamatoria, regulando la expresión de mediadores inflamatorios y la expresión de moléculas de adhesión.

La lesión pulmonar aguda y el síndrome disneico agudo (ARDS) se caracterizan por la presencia de extrusados inflamatorios ricos en fibrina en los espacios intraalveolares, y por la gran migración de neutrófilos a los alvéolos de los pulmones. El bloqueo farmacológico de TNF- α , y la señalización de C5a en neutrófilos procedentes de voluntarios sanos, fue capaz de disminuir significativamente la actividad procoagulante inducida por BALF de estas células de otro modo normales, y de causar una pérdida concomitante de la expresión del factor tisular (TF). Estos resultados indican que la señalización de C5a y TNF- α contribuye a la inducción de la expresión de TF en neutrófilos que se acumulan en los alvéolos de pulmones afectados por ARDS.

Durante el comienzo de la septicemia, el sistema inflamatorio se hace hiperactivo, implicando al mecanismo de defensa tanto celular como humoral. Se ha mostrado que la activación del complemento durante la septicemia humana, especialmente como se refleja en niveles elevados de C5a, está asociada con tasas de supervivencia significativamente reducidas, junto con fallo multiorgánico, cuando se compara con pacientes sépticos menos graves y con supervivientes. Además, la interceptación de C5a o C5aR mejora drásticamente la supervivencia durante la septicemia experimental en roedores. De este modo, C5a parece ser un jugador clave para el desarrollo de septicemia, y la interferencia de la unión de C5a/C5aR puede presentar un enfoque clínico potente para el tratamiento preventivo de pacientes con riesgo elevado de desarrollar septicemia.

En derivación cardiopulmonar y hemodiálisis, C5a se genera como resultado de la activación de la ruta alternativa del complemento cuando la sangre humana entra en contacto con la superficie artificial del sistema de circulación extracorporeal o con el riñón artificial. C5a provoca mayor permeabilidad capilar y edema, broncoconstricción, vasoconstricción pulmonar, activación de leucocitos y plaquetas e infiltración en tejidos, en particular el pulmón. Se mostró que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-C5a reduce el baipás cardiopulmonar y la disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplegia.

La activación del complemento accionada por tumores puede proporcionar una ventaja al crecimiento tumoral. La generación de complemento C5a en un microentorno tumoral potencia el crecimiento tumoral al suprimir la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8⁺. El uso de un modelo de ratón de crecimiento tumoral reveló que la deficiencia o bloqueo de C5aR está asociado con el retraso del crecimiento tumoral. Por lo tanto, se considera que la inhibición del complemento es un enfoque eficaz y prometedor en la terapia contra el cáncer.

Un incremento significativo de la activación del complemento estaba asociado con diferentes desenlaces patológicos del embarazo, a saber, preeclampsia, abortos espontáneos recurrentes, retraso del crecimiento intrauterino, y síndrome antifosfolípido (APS). Las mujeres con preeclampsia mostraron una mayor concentración plasmática de C5a, en comparación con mujeres embarazadas normales. Con respecto a APS, los anticuerpos antifosfolípido y la activación del complemento (vía C3a, C5a, y MAC) pueden cooperar en el accionamiento de un proceso inflamatorio local, que conduce eventualmente a trombosis placentaria, hipoxia, e infiltración de neutrófilos. El factor tisular (TF) representa el enlace entre C5a y la activación de neutrófilos en la lesión fetal inducida por anticuerpos antifosfolípido.

Es decir, la respuesta inmunitaria inducida por péptidos contra C5a da como resultado una terapia eficaz para enfermedades (inflamatorias crónicas) mediadas por C5a, incluyendo enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (ver, por ejemplo, Fonseca, M.I. et al. (2009), J Immunol "Treatment with a C5aR Antagonist Decreases Pathology and Enhances Behavioral Performance in Murine Models of Alzheimer's Disease." y Klos, A. et al. (2009), Mol Immunol "The role of the anaphylatoxins in health and disease."), enfermedad de Parkinson's (ver, por ejemplo, McGeer, P. L. et al. (2004), Parkinsonism Relat Disord "Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease."), enfermedad de Huntington (ver, por ejemplo, Singhrao, S. K. et al. (1999), Exp Neurol "Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease.") y degeneración macular relacionada con la edad (ver, por ejemplo, Nozaki, M. et al. (2006), Proc Natl Acad Sci "Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization."), artritis reumatoide (ver, por ejemplo, Okroj, M. et al. (2007), Ann Med "Rheumatoid arthritis and the complement system."), lupus eritematoso sistémico (SLE) (ver, por ejemplo, Chen, M. et al. (2009), J Autoimmun "The complement system in systemic autoimmune disease."; Jacob, A. et al. (2010), J Neuroimmunol "Inhibition of C5a receptor alleviates experimental CNS lupus." y Jacob, A. et al. (2010), FASEB J "C5a alters blood-brain barrier integrity in experimental lupus."), asma (ver, por ejemplo, Kohl, J. et al. (2006), J Clin Invest "A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma."), vasculitis, síndrome antifosfolípido (APS), aterosclerosis, dermatitis inflamatoria, tal como psoriasis y urticaria crónica, síndrome de Guillain-Barre, síndrome urémico hemolítico, y esclerosis múltiple. Puesto que la liberación descontrolada de hC5a contribuye a otras afecciones patológicas tales como lesión por isquemia y reperusión, septicemia, lesión pulmonar aguda, complicaciones asociadas con hemodiálisis, cáncer, complicación del embarazo tal como preeclampsia y APS, la neutralización de C5a mediante inmunización activa puede

proporcionar asimismo una terapia eficaz para estas complicaciones patológicas.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una vacuna que comprende LRANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 1) o un fragmento peptídico de la misma, acoplada o fusionada a una proteína portadora que comprende por lo menos un epítipo de linfocitos T, en la que dicho fragmento peptídico comprende por lo menos 7 restos de aminoácidos y la secuencias de aminoácidos KDMQLGR (SEC ID nº: 7) o KDMQLG (SEC ID nº: 23), con la condición de que el fragmento peptídico no consista en las secuencias de aminoácidos HKDMQLGR (SEC ID nº: 16).

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de LRANISHKDMQCGR (SEC ID nº: 1), RANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 2), ANISHKDMQLGR (SEC ID nº: 3), NISHKDMQLGR (SEC ID nº: 4), ISHKDMQLGR (SEC ID nº: 5), SHKDMQLGR (SEC ID nº: 6), KDMQLGR (SEC ID nº: 7), LRANISHKDMQLG (SEC ID nº: 8), RANISHKDMQLG (SEC ID nº: 9), ANISHKDMQLG (SEC ID nº: 10), NISHKDMQLG (SEC ID nº: 11), ISHKDMQLG (SEC ID nº: 12) y SHKDMQLG (SEC ID nº: 13).

La presente invención se ilustra con mayor detalle en las siguientes figuras y ejemplos, sin, sin embargo, estar limitada a los mismos.

La figura 1 representa el ensayo de inmunogenicidad del fragmento C-terminal inmunogénico largo de 20 aminoácidos descrito previamente de hC5a (SEC ID nº: 14), las partes N-terminal y la C-terminal del mismo (SEC ID nº: 7 y 24).

La figura 2 representa la respuesta inmunitaria frente a hC5a inducida por péptidos que cubren 20 a 4 aminoácidos del extremo C de hC5a (SEC ID nº: 1-7 y SEC ID nº: 14-19).

La figura 3 representa la respuesta inmunitaria frente a hC5a inducida por péptidos que cubren 19 a 6 aminoácidos del fragmento de hC5a C-terminal sin arginina en la posición 74 (SEC ID nº: 8-13 y SEC ID nº: 20-23).

La figura 4 representa la evaluación de la actividad funcional de los anticuerpos inducidos mediante inmunización con SEC ID nº: 1-7 y SEC ID nº: 14-17.

La figura 5 representa la evaluación de la actividad funcional de los anticuerpos inducidos por la inmunización con SEC ID nº: 8-13 y SEC ID nº: 20-23.

La figura 6 representa la prevención de neutropenia inducida por C5a humano en conejos mediante inmunización con SEC ID nº: 3 y SEC ID nº: 7 de la presente invención.

Ejemplos

El objetivo de la presente invención es desarrollar una respuesta inmunitaria activa neutralizante frente a C5a humano excesivo, para evitar su actividad patológica. En el enfoque descrito, se selecciona como diana el neoepítipo C-terminal, que se hace accesible con la escisión de la proteína C5 mediante la C5 convertasa. De este modo, mediante vacunación, se mantendrá el papel de C5b en la defensa del hospedante, mientras que se supone que se bloqueará la actividad excesiva de la anafilatoxina C5a.

Materiales y métodos:

Inmunización de ratones

Ratones BALB/c hembras (6-8 semanas) se vacunaron por primera vez y se volvieron a inmunizar cuatro veces en intervalos bisemanales con vacunas de péptido conjugado con KLH (200 µl subcutáneamente en amortiguador de fosfato pH 7.4). Como adyuvante, se usó hidróxido de aluminio. Para la inyección con la vacuna respectiva del péptido conjugado a KLH, se usaron cinco a seis ratones. Los experimentos se repitieron, y sus representativos se muestran a continuación.

Los títulos de los anticuerpos de los sueros de ratón se analizaron mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Los títulos se calcularon como la dilución de sueros que da la unión semimáxima (es decir, $OD_{max}/2$), y se representan los títulos de la mediana de 5 o 6 ratones por grupo. La actividad funcional de los anticuerpos inducidos se evaluó mediante el ensayo de liberación de la enzima glucuronidasa.

Ejemplo 1: Ensayo de inmunogenicidad del fragmento C-terminal inmunogénico largo de 20 aminoácidos de hC5a descrito previamente, las partes N-terminal y la C-terminal del mismo.

En este ejemplo, el fragmento C-terminal largo de 20 aminoácidos de C5a humano (SEC ID nº: 14), así como la

parte N-terminal (SEC ID nº: 24) y la parte C-terminal (SEC ID nº: 7) del mismo, se ensayaron para determinar su inmunogenicidad. Los ratones se inmunizaron con los péptidos indicados, y los títulos de la mediana de los anticuerpos inducidos contra hC5a se muestran en la figura 1.

- 5 La posición 55-74 del fragmento de hC5a (SEC ID nº: 14), así como su parte C-terminal (SEC ID nº: 7), fueron capaces de inducir títulos contra hC5a, pero no su parte N-terminal (SEC ID nº: 24) (figura 1). De este modo, la parte C-terminal (SEC ID nº: 7) del péptido 20mero es crucial para la inducción de una respuesta inmunitaria humoral contra hC5a, mientras que el fragmento N-terminal (SEC ID nº: 24) es insignificante.

10 **Ejemplo 2: Respuesta inmunitaria contra hC5a inducida por péptidos que cubren 20 a 4 aminoácidos del extremo C de hC5a (SEC ID nº: 1-7 y SEC ID nº: 14-19).**

Se estudiaron trece péptidos derivados de hC5a C-terminales, que varían de 20 a 4 restos de aminoácidos (SEC ID nº: 1-7 y SEC ID nº: 14-19 como se indica en la Tabla 2), para determinar su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria humoral contra hC5a.

Los ratones se inmunizaron con los péptidos indicados, y los títulos de la mediana de los anticuerpos inducidos contra hC5a se muestran en la figura 2. Todos los péptidos C-terminales ensayados fueron capaces de inducir anticuerpos que se unen al péptido inyectado (dato no representado); solamente 7 péptidos indujeron títulos elevados contra la proteína hC5a, como se muestra en la figura 2 (recuadrado). Los péptidos C-terminales más cortos que 7 aminoácidos (SEC ID nº: 17-19) no inducen una respuesta inmunitaria humoral relevante contra hC5a (figura 2). En todos los casos, no se observó una respuesta inmunitaria contra la proteína C5 sin escindir (dato no representado).

25 **Ejemplo 3: Respuesta inmunitaria contra hC5a inducida por péptidos que cubren 19 a 5 aminoácidos del extremo C de hC5a, sin arginina en la última posición (SEC ID nº: 8-13 y SEC ID nº: 20-23).**

Se usaron diez péptidos derivados de hC5a C-terminales sin la arginina en la última posición (SEC ID nº: 8-13 y SEC ID nº: 20-23, como se indica en la Tabla 2) para provocar anticuerpos contra hC5a. Los ratones se inmunizaron con los péptidos indicados, y los títulos de la mediana de los anticuerpos inducidos contra hC5a se muestran en la figura 3. Todos los péptidos ensayados fueron capaces de inducir anticuerpos que se unen al péptido inyectado (dato no representado), pero solamente SEC ID nº: 8-13 y SEC ID nº: 22-23 mostraron una respuesta elevada frente a hC5a (figura 3, recuadrado). No se observó una respuesta inmunitaria contra la proteína C5 sin escindir (dato no representado).

35 **Ejemplo 4: Evaluación de la actividad funcional de los anticuerpos inducidos por inmunización con péptidos C-terminales con arginina (SEC ID nº: 1-7 y SEC ID nº: 14-17) y sin arginina en la última posición (SEC ID nº: 8-13 y SEC ID nº: 20-23).**

40 La actividad inhibidora de los anticuerpos contra hC5a inducidos por el péptido se evaluó mediante el ensayo de liberación de la enzima glucuronidasa. La β -glucuronidasa es liberada a partir de células U937 humanas diferenciadas al estimularlas con hC5a. Este efecto se puede bloquear mediante la adición de sueros inmunitarios anti-hC5a inducidos por el péptido, lo que se muestra en las figuras 4 y 5.

45 De forma breve, células U937 se diferenciaron durante 5 días con 3':5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) 0.5 mM en RPMI, 10% de FCS. En el día 5, las células se trataron previamente con citocalasina B (2.5 μ g/ml) durante 10 minutos a 37°C. Para cada enfoque, 1.8×10^5 células pretratadas se estimularon con 25 nM de hC5a solo, o con 25 nM de hC5a y 4% de suero derivado de ratones inmunizados con diferentes péptidos (SEC ID nº: 1-17 y SEC ID nº: 20-23, como se indica en la Tabla 2), en un volumen final de 120 μ l de amortiguador de HAG-CM (20 mM de HEPES pH = 7.4, 125 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0.5 mM de glucosa, 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 0.25% de BSA). Tras incubar durante 10 minutos a 37°C, las células se peletizaron, el sobrenadante se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se diluyó 1:1 con 0.01 M de P-nitrofenil- β -D-glucurónido (disuelto en 0.1 M de acetato de sodio pH = 4.0) en un volumen total de 150 μ l. La placa de microtitulación se incubó durante 1 h a 37°C en la oscuridad. Después, la reacción se detuvo mediante adición de 0.4 M de amortiguador de glicina (pH = 10.0). La β -glucuronidasa convierte P-nitrofenil- β -D-glucurónido en un color amarillento que se lee a 405 nm.

En las figuras 4 y 5 se muestra la liberación de glucuronidasa (indicada como la absorción a 405 nm) de células estimuladas con hC5a, con y sin la adición de sueros inmunitarios inducidos por péptido (conjuntos de 6 a 5 animales). Los sueros inmunitarios con la mejor actividad inhibidora, SEC ID nº: 1-7, y SEC ID nº: 8-13, están comprendidos en la presente invención (figuras 4 y 5, recuadrado).

En general, se observa una buena correlación del título y la actividad funcional de los sueros inducidos por el péptido (figuras 2, 3, 4, y 5). Sin embargo, los sueros inmunitarios de las SEC ID nº: 16, 22, y 23 fueron capaces de inducir buenos títulos contra hC5a (figuras 2 y 3), pero mostraron una actividad funcional solamente limitada

en el ensayo de glucuronidasa (figuras 4 y 5). Estos péptidos, que tuvieron un resto de histidina en el extremo N, o que fueron más cortos de 7 restos de aminoácidos, no indujeron anticuerpos funcionalmente activos contra hC5a, y por lo tanto se excluyeron del panel de péptidos de la presente invención.

5 Ejemplo 5: Evaluación *in vivo* de la presente invención, una inmunización activa contra hC5a inducida por péptido.

Es bien conocido que la activación del complemento induce una neutropenia/neutrofilia transitoria en el modelo de animal. La inyección de C5a humano purificado, en conejos, mostró una neutropenia inmediata, que dura solamente unos pocos minutos, seguido de una neutrofilia significativa que persiste durante un período de 4 horas. Los neutrófilos que circularon son activados por C5a, y de ese modo se deforman y se convierten en adherentes, conduciendo a una neutropenia, secuestro, y agotamiento de células de la circulación. Tras el suceso neutropénico, se requiere una respuesta neutrofílica inmediata para la sustitución de esta población celular particular y para restablecer la homeostasis.

Se evaluó el efecto de la inmunización activa contra hC5a inducida por péptidos en el modelo *in vivo* de modelo de neutropenia inducida por C5a humano en conejos.

20 Inmunización de conejos

Unos conejos blancos machos New Zealand (6-8 semanas) se vacunaron por primera vez y se volvieron a inmunizar cuatro veces bisemanalmente mediante inyecciones subcutáneas (200 μ l en la parte inferior de la espalda, y 200 μ l en el muslo) con vacunas de péptido conjugado con KLH. Como adyuvante, se usó hidróxido de aluminio. Se usaron cuatro conejos para la inyección con la vacuna del péptido conjugado con KLH respectiva.

Para el procedimiento de inmunización descrito anteriormente, se usó la SEC ID n°: 14 (Tabla 2), las SEC ID n°: 3 y SEC ID n°: 7, ambas representativas para los péptidos C-terminales derivados de hC5a reivindicados por la presente invención (Tabla 1), y la proteína portadora KLH sola. Después de la tercera inyección de recuerdo, a todos los conejos se les inyectaron 2 μ g/kg de hC5a en la vena marginal de la oreja derecha, y se recogió sangre de la arteria central de la oreja izquierda 6 minutos después de la inyección. Se determinó el número de granulocitos, y se comparó con el número de granulocitos de la sangre previa recogida dos minutos antes de la inyección de hC5a. En la figura 6 se presentan los valores de la mediana de cada grupo.

Este ejemplo reveló una reducción clara de la neutropenia inducida por hC5a en ratones que se inmunizaron con representantes de los compuestos de la presente invención (vacunas del péptido conjugado con KLH de SEC ID n°: 3 y SEC ID n°: 7), pero no en conejos inmunizados con la vacuna de SEC ID n°: 14 conjugada con KLH, o inmunizados con KLH sola.

40 Tabla 1. Fragmentos C-terminales de hC5a usados en la presente invención para una respuesta inmunitaria activa inducida por péptidos frente a hC5a.

Número de identificación de la secuencia	Posición de los aminoácidos de hC5a (>gij109731812)	Secuencia
SEC ID n°: 1	61-74	LRANISHKDMQLGR
SEC ID n°: 2	62-74	RANISHKDMQLGR
SEC ID n°: 3	63-74	ANISHKDMQLGR
SEC ID n°: 4	64-74	NISHKDMQLGR
SEC ID n°: 5	65-74	ISHKDMQLGR
SEC ID n°: 6	66-74	SHKDMQLGR
SEC ID n°: 7	68-74	KDMQLGR
SEC ID n°: 8	61-73	LRANISHKDMQLG
SEC ID n°: 9	62-73	RANISHKDMQLG
SEC ID n°: 10	63-73	ANISHKDMQLG
SEC ID n°: 11	64-73	NISHKDMQLG
SEC ID n°: 12	65-73	ISHKDMQLG
SEC ID n°: 13	66-73	SHKDMQLG

45 Tabla 2. Péptidos usados para estudios de inmunogenicidad como se describen en los EJEMPLOS 1, 2, y 3.

Número de identificación de la secuencia	Posición de los aminoácidos de hC5a (>gij109731812)	Secuencia
SEC ID n°: 14	55-74	CVVASQLRANISHKDMQLGR
SEC ID n°: 15	60-74	QLRANISHKDMQLGR
SEC ID n°: 1	61-74	LRANISHKDMQLGR

Número de identificación de la secuencia	Posición de los aminoácidos de hC5a (>gi 109731812)	Secuencia
SEC ID nº: 2	62-74	RANISHKDMQLGR
SEC ID nº: 3	63-74	ANISHKDMQLGR
SEC ID nº: 4	64-74	NISHKDMQLGR
SEC ID nº: 5	65-74	ISHKDMQLGR
SEC ID nº: 6	66-74	SHKDMQLGR
SEC ID nº: 16	67-74	HKDMQLGR
SEC ID nº: 7	68-74	KDMQLGR
SEC ID nº: 17	69-74	DMQLGR
SEC ID nº: 18	70-74	MQLGR
SEC ID nº: 19	71-74	QLGR
SEC ID nº: 20	55-73	CVVASQLRANISHKDMQLG
SEC ID nº: 21	60-73	QLRANISHKDMQLG
SEC ID nº: 8	61-73	LRANISHKDMQLG
SEC ID nº: 9	62-73	RANISHKDMQLG
SEC ID nº: 10	63-73	ANISHKDMQLG
SEC ID nº: 11	64-73	NISHKDMQLG
SEC ID nº: 12	65-73	ISHKDMQLG
SEC ID nº: 13	66-73	SHKDMQLG
SEC ID nº: 22	67-73	HKDMQLG
SEC ID nº: 23	68-73	KDMQLG
SEC ID nº: 24	55-64	CVVASQLRAN

Listado de secuencias

- 5 <110> Affiris AG
- <120> Vacuna
- <130> R 60359
- 10 <150> EP 10196232.2
- <151> 2010 12 21
- <160> 24
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fragmento de C5a
- 25 <400> 1
- Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 13
- 30 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fragmento de C5a
- 35 <400> 2
- Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
- 1 5 10
- <210> 3
- 40 <211> 12
- <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 5 <400> 3
 Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5 10
 <210> 4
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Fragmento de C5a
 <400> 4
 Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5 10
 20 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 <400> 5
 Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5 10
 30 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 <400> 6
 Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5
 40 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 50 <400> 7
 Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5
 <210> 8
 <211> 13
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 60 <400> 8

Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 10 <400> 9
 Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5 10
 <210> 10
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Fragmento de C5a
 <400> 10
 Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5 10
 25 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 <400> 11
 Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5 10
 35 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 <400> 12
 Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 45 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de C5a
 55 <400> 13
 Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5
 <210> 14
 <211> 20
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de C5a

5 <400> 14
 Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Arg
 20

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

<220>
 <223> Fragmento de C5a

15 <400> 15
 Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5 10 15

<210> 16
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Fragmento de C5a

<400> 16
 His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5

30 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Fragmento de C5a

<400> 17
 Asp Met Gln Leu Gly Arg
 1 5

40 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Fragmento de C5a

<400> 18
 Met Gln Leu Gly Arg
 1 5

50 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de C5a

<400> 19
 Gln Leu Gly Arg
 1

5 <210> 20
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de C5a

<400> 20
 Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met
 1 5 10 15

Gln Leu Gly

15 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Fragmento de C5a

<400> 21
 Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5 10

25 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Fragmento de C5a

35 <400> 22
 His Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Fragmento de C5a

45 <400> 23
 Lys Asp Met Gln Leu Gly
 1 5

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Fragmento de C5a

55 <400> 24
 Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
 1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende por lo menos un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos ANISHKDMQLGR (SEC ID nº 3), NISHKDMQLGR (SEC ID nº: 4), SHKDMQLGR (SEC ID nº: 6) o KDMQLGR (SEC ID nº: 7) que se acopla o fusiona a una proteína portadora que comprende por lo menos un epítipo de linfocitos T para la utilización en el tratamiento de un trastorno mediado por complemento, en la que el trastorno mediado por complemento se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), artritis reumatoide (RA), síndrome antifosfolípido, asma, y aterosclerosis.
- 10 2. Vacuna según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho por lo menos un péptido comprende en su extremo N por lo menos un resto de cisteína unido directamente o mediante una secuencia espaciadora al mismo.
- 15 3. Vacuna según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la proteína portadora se selecciona de entre el grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetánico (TT) o toxina de la difteria (DT).
- 20 4. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que se formula con un adyuvante, preferentemente adsorbido sobre alumbre.

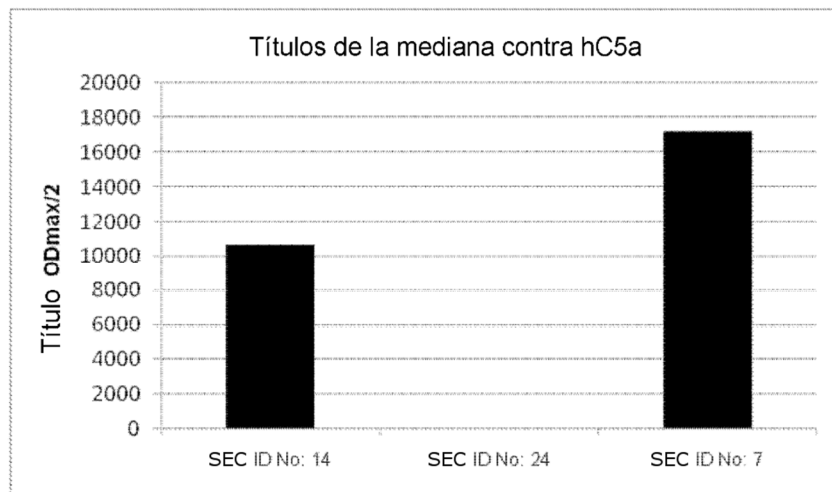


Fig. 1

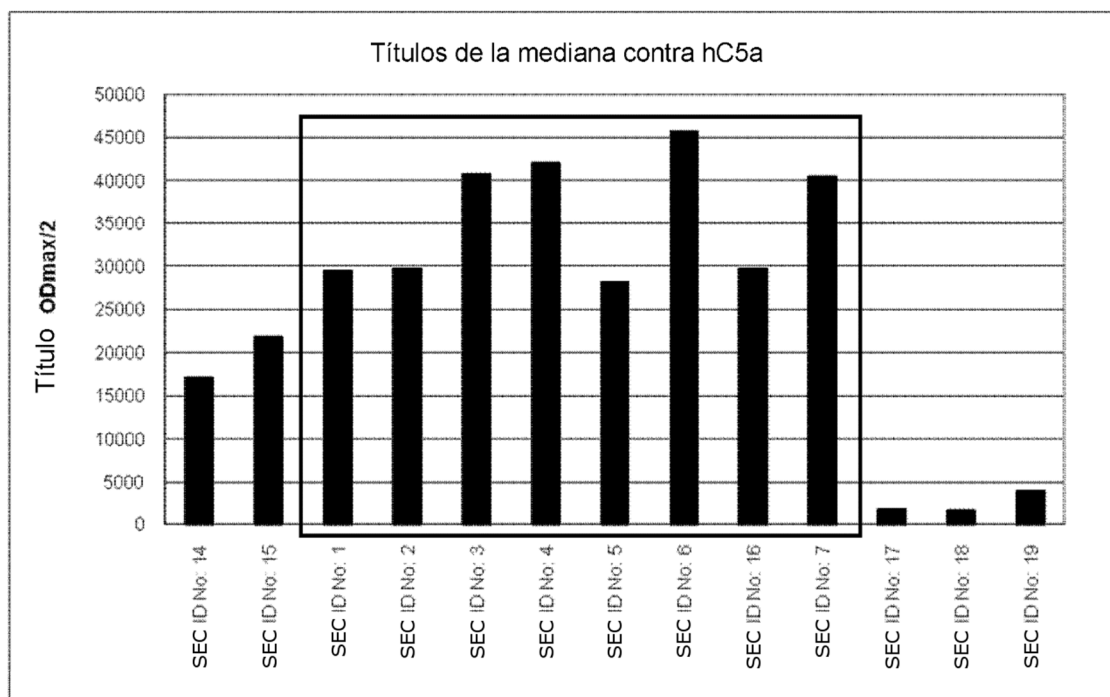


Fig. 2

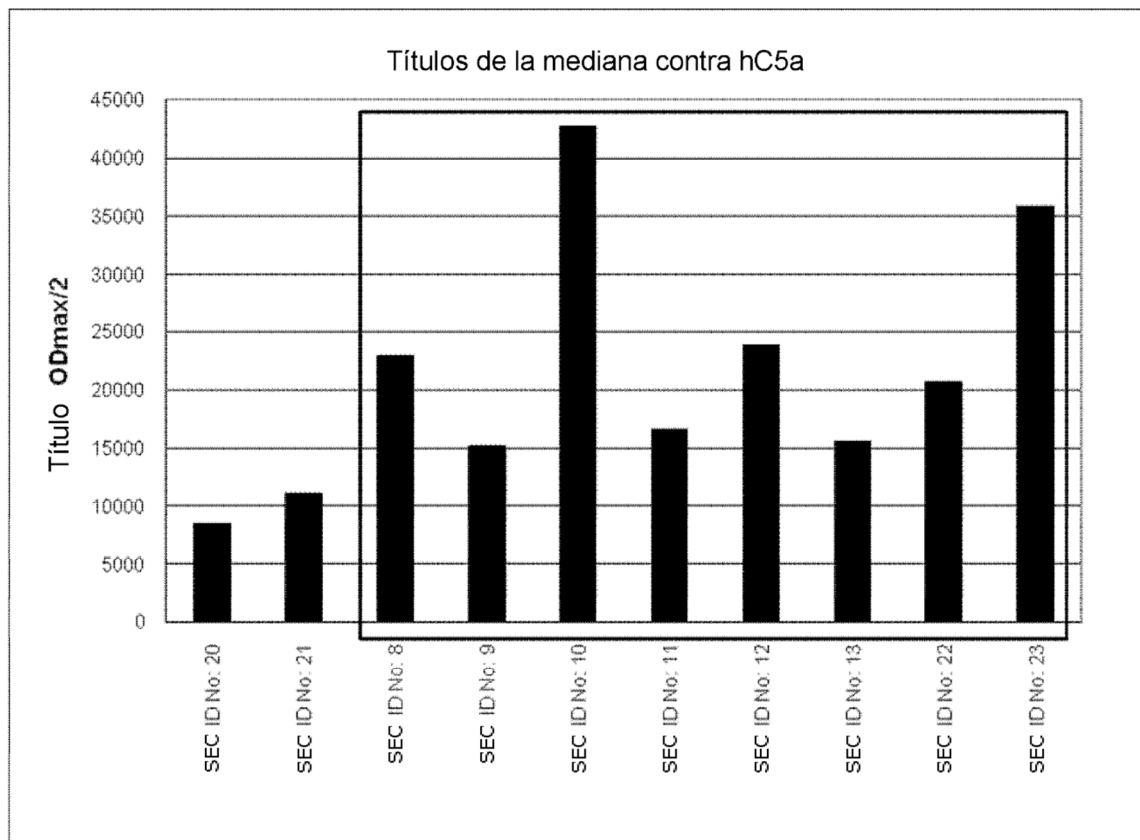


Fig. 3

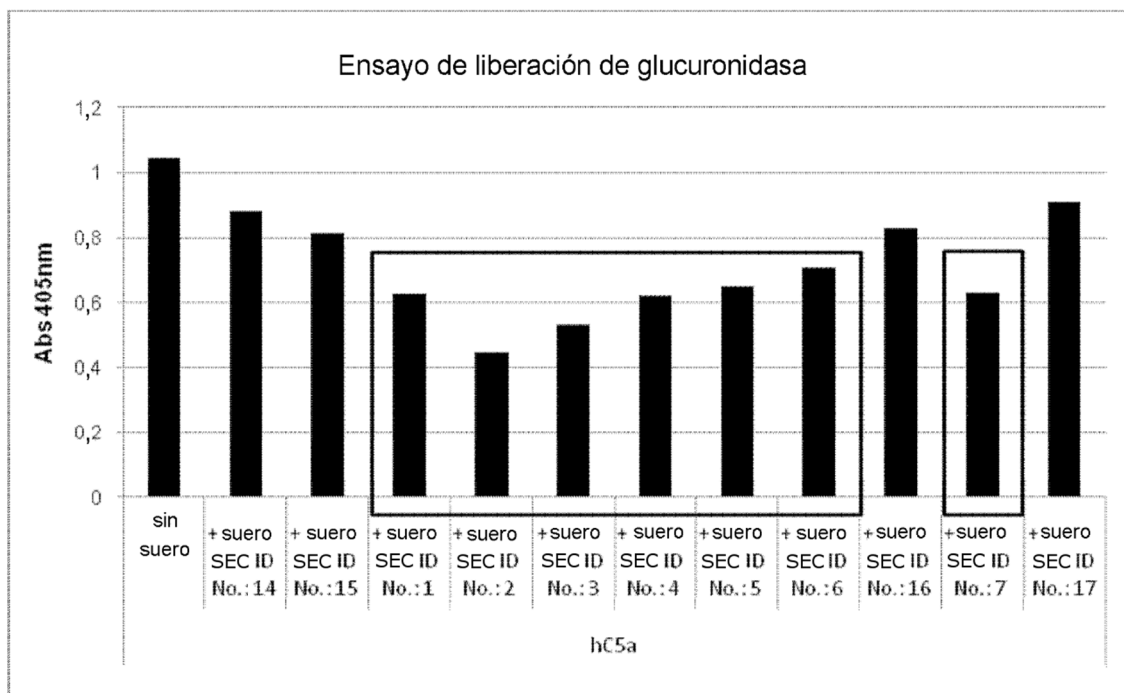


Fig. 4

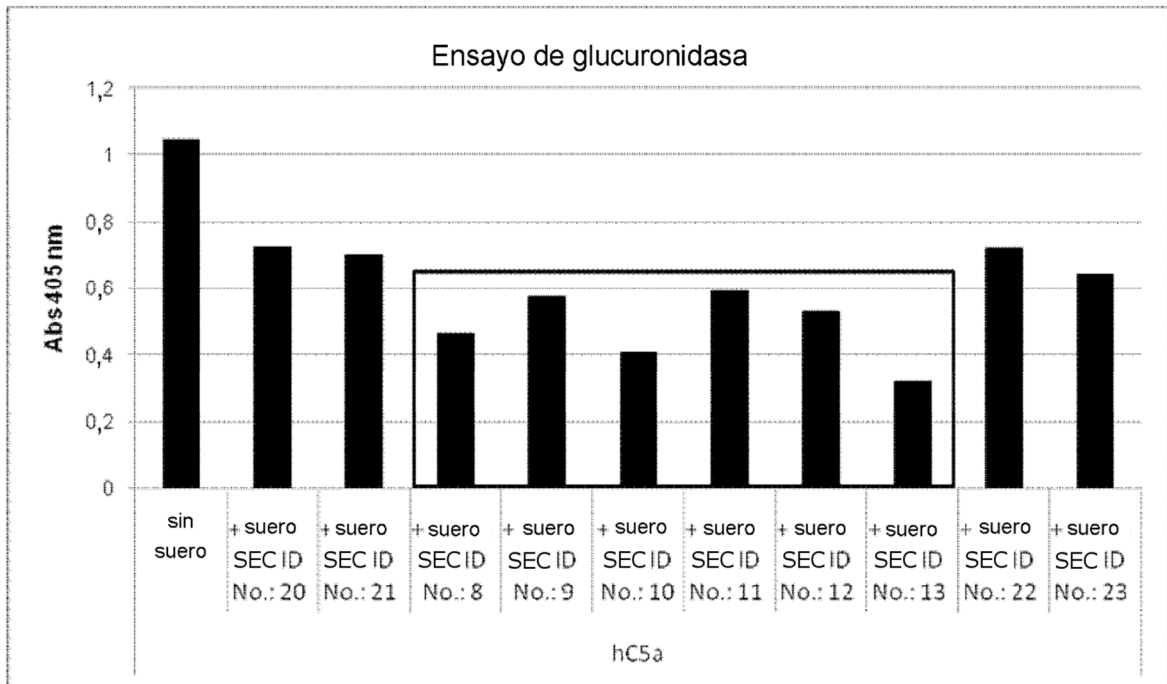


Fig. 5

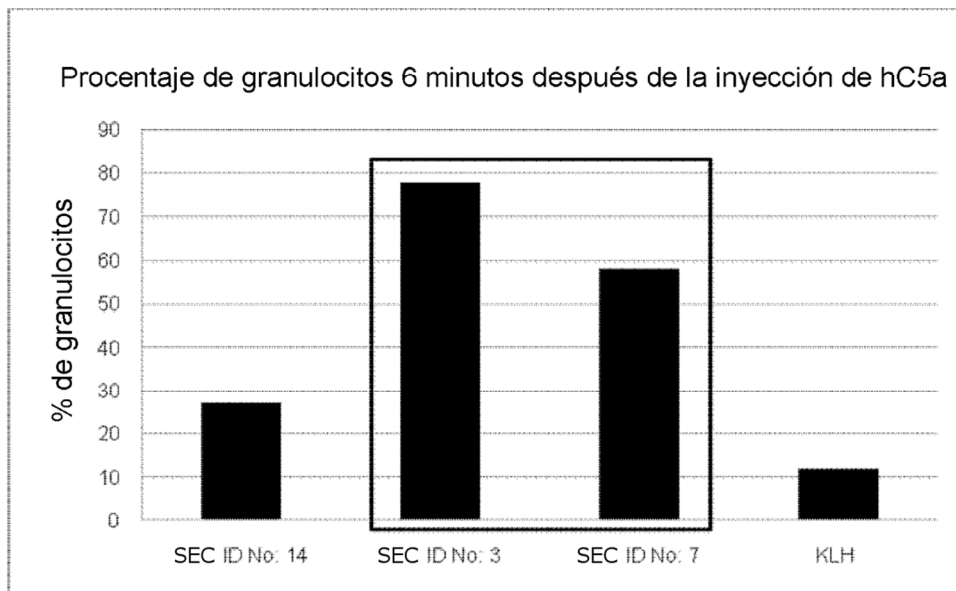


Fig. 6