



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 118**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04816198 .8**

96 Fecha de presentación : **15.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1668036**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54

Título: **Procedimiento para la obtención de anticuerpos humanos que neutralizan la actividad biológica de una citoquina humana.**

30

Prioridad: **16.09.2003 FR 03 50543**

73

Titular/es: **NEOVACS**
3-5 Impasse Reille
75014 Paris, FR

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2011

72

Inventor/es: **Bizzini, Bernard;**
Zagury, Daniel y
Le Buanec, Hélène

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2011

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 118 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

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a unas composiciones vacunales.

TÉCNICA ANTERIOR

5 Las citoquinas son unas proteínas producidas por numerosas células, tales como los linfocitos, monocitos, células dendríticas, mastocitos, fibroblastos, que ejercen unos efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos sobre numerosos tejidos. Las citoquinas influyen en la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la migración celular. Las citoquinas pueden ser agrupadas, bastante esquemáticamente según su actividad, y algunas son importantes en la inducción de la muerte celular, por un efecto directo o indirecto, a través de la generación de linfocitos citotóxicos o de células NK (IFN γ , TFN, IL-2, IL-15). Otras citoquinas participan en las respuestas alérgicas tales como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Algunas son esenciales en la regulación de la producción de los anticuerpos (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 e IL-13) mientras que otras ejercen una acción pro-inflamatoria (IL-1, TNF α , IFN γ , quimioquinas). Otras citoquinas poseen también unas propiedades anti-inflamatorias (TGF- β , IL-4, IL-10). Esta clasificación no refleja sin embargo la complejidad de las interacciones entre las citoquinas y sus dianas celulares, caracterizadas por una redundancia y un pleiotropismo importante, sin hablar de los efectos agonistas y antagonistas. Estas características del sistema inmunitario y de las citoquinas en particular explican que cualquier interferencia con su funcionamiento, a través de por ejemplo un anticuerpo que bloquea una citoquina, tiene unos efectos importantes *in vivo*.

20 Hasta ahora, las estrategias de terapia vacunal tenían como diana principalmente dirigidas sobre el agresor antigénico, ya fuera un microorganismo, una célula o un alérgeno, pero no buscaban combatir la desregulación de las citoquinas. Sin embargo, debido al papel clave de las citoquinas, implicadas por ejemplo en los fenómenos de escape a las defensas inmunitarias, o en los fenómenos de inflamación, su desactivación en unos pacientes con el fin de actuar sobre su actividad o su producción es un objetivo en la actualidad buscado habitualmente, particularmente cuando el organismo no dispone de antagonistas naturales susceptibles de equilibrar eficazmente estas citoquinas. Se conocen, por ejemplo, unos anticuerpos anticitoquina, pero estos últimos son de título poco elevado debido a que las células B que los producen están latentes. Además, estos anticuerpos naturales son de baja afinidad y no neutralizan la actividad de la citoquina correspondiente.

30 En particular, el fenómeno de escape a las defensas inmunitarias celulares del hospedante por inducción de su parálisis *in situ* es una estrategia utilizada por numerosos cánceres y es necesario para su supervivencia. Inicialmente, la inmunosupresión sigue localizada a nivel del tumor, debido a que el individuo es todavía capaz de defenderse contras las demás agresiones tales como las infecciones. Sin embargo, en una etapa más tardía, esta inmunosupresión puede extenderse, generalizarse, tal como lo demuestran la diseminación de metástasis y la gran vulnerabilidad de la persona que padece cáncer frente a las infecciones, fuera incluso de los efectos que se deben a la quimioterapia o radioterapia. En resumen, este escape al control del sistema inmunitario se debe a una parálisis del sistema inmunitario (inmunosupresión), que le impide funcionar normalmente. Esta inmunosupresión utiliza unos factores paralizantes, incluyendo unas citoquinas, producidos por las células cancerígenas o su entorno. La parálisis local de las células del sistema inmunitario o inmunosupresión representa por lo tanto un arma importante de las células cancerígenas que les permite escapar al sistema inmunitario del hospedante.

40 El fenómeno de escape a las defensas inmunitarias celulares del hospedante por inducción de su parálisis *in situ* es una estrategia utilizada asimismo por el VIH. La inmunosupresión generalizada observada en el caso del SIDA se caracteriza en particular por una sobreproducción de IFN α por las células que presentan el antígeno y particularmente las células dendríticas de tipo 2 (DC2). Las actividades inmunosupresoras del IFN α se deben a su capacidad para inducir la producción de la citoquina IL-10 por las células T reguladoras (denominadas anteriormente T supresoras).

45 Una primera estrategia de inhibición de la actividad biológica de las citoquinas consiste en inyectar una construcción inmunógena a un paciente. A título de ejemplo, con el fin de provocar el reconocimiento de un antígeno de interés, por ejemplo una citoquina, por las células B, se han realizado diversas construcciones inmunógenas en el estado de la técnica. Una forma de estas construcciones inmunógenas consiste en un acoplamiento covalente del antígeno de interés sobre una molécula portadora, aportando la molécula portadora unas estructuras reconocidas por los linfocitos T auxiliares (células "T helper"), en asociación con unas moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), y que activan los linfocitos T auxiliares que producen entonces diversas citoquinas, incluyendo la IL-2, citoquinas que activarán a su vez los clones de células B específicas del antígeno de interés. Las células B específicas del antígeno de interés, una vez activadas, se multiplicarán y producirán unos anticuerpos específicos del antígeno de interés, siendo éste el objetivo buscado. En general, este tipo de construcciones inmunógenas consiste en unos productos de acoplamiento químico covalente entre el antígeno de interés y la molécula portadora, los cuales, después de una etapa de purificación y de eliminación de los productos no acoplados, son unos productos finales de estructura química bien definida.

55 Sin embargo, dichas construcciones inmunógenas adolecen de unos inconvenientes, entre los cuales se puede citar el plazo importante entre la inyección de dichas construcciones y la aparición de una respuesta inmune dirigida contra la citoquina diana. Además, a veces es imposible vacunar eficazmente a los pacientes con unas construcciones inmunógenas anticitoquinas, cuando dichas citoquinas alteran justamente la intensidad o la calidad de la respuesta

inmune. En efecto, en el marco por ejemplo del cáncer o del SIDA, en los que se observa una inmunosupresión de gran amplitud, la administración de una composición inmunógena debe intervenir, para ser eficaz, en una etapa precoz de la enfermedad, en particular antes de que la inmunosupresión sea demasiado importante.

5 Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de unos anticuerpos anti-citoquinas que permitan tratar a los pacientes que presentan una depresión del sistema inmunitario. Estos anticuerpos actúan directamente sobre las citoquinas implicadas en la inmunosupresión o también en el proceso inflamatorio. Dicho tratamiento mediante unos anticuerpos anticitoquinas permite restablecer por lo menos temporalmente la respuesta inmunitaria y puede servir entonces previamente a la administración de composiciones inmunógenas.

10 En el estado de la técnica se conocen ya unos anticuerpos anti-citoquinas. Se puede citar a título de ejemplo la solicitud de patente EP 1 285 930 y la solicitud de patente US nº 6.509.015 correspondiente que describen unos anticuerpos humanos, y en particular unos anticuerpos recombinantes humanos, que se unen de manera específica al TNF α , una citoquina producida en numerosos tipos celulares, y conocida por su papel en las enfermedades autoinmunes, las infecciones o los rechazos de injerto.

15 Se puede citar asimismo la solicitud internacional WO 00/56772 que describe unos anticuerpos humanos, preferentemente recombinantes, que se unen específicamente a la IL-2 humana, y que neutralizan su actividad *in vivo* e *in vitro*.

20 Se pueden citar asimismo las investigaciones de Zagury *et al.*, que describen la obtención, en unos pacientes inmunodeficientes asintomáticos infectados por el virus VIH, de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el interferón α , mediante la administración en estos pacientes de moléculas de interferón α desactivado (véase Zagury *et al.*, 1999, Biomed & Pharmcother, Vol. 53: 90-92).

Por último, se puede citar la solicitud de patente US 2003/0099647 que describe unos agentes de unión al interferón γ y en particular unos dominios de unión a unos anticuerpos y a unos antígenos que se unen selectivamente al IFN γ y que pueden ser utilizados para prevenir o tratar unas enfermedades inflamatorias o autoinmunes tales como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso.

25 Teniendo en cuenta el papel clave de las citoquinas recordado anteriormente, existe una necesidad permanente de nuevas composiciones vacunales capaces de inducir unos anticuerpos aptos para unirse a unas citoquinas de interés y neutralizar por lo menos parcialmente su actividad biológica. Es importante que dichas composiciones sean poco costosas, simples de preparar y que puedan ser sintetizadas de manera reproducible.

SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona unas composiciones vacunales que comprenden, a título de principio activo un producto inmunógeno estable así como sus utilizaciones, tal como se define en las reivindicaciones.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

35 Se ha mostrado según la invención que nuevos anticuerpos humanos con alta capacidad de neutralización de la actividad de una citoquina humana, podían ser producidos mediante la inmunización de un ser humano contra dicha citoquina, sin la necesidad de etapas complejas de cribado celular y de purificación de los procedimientos de la técnica anterior. Es útil precisar, para más claridad, que un individuo no inmunizado contra una citoquina no posee, naturalmente, ningún anticuerpo que neutralice la actividad de dicha citoquina.

40 Dichos anticuerpos anti-citoquinas son útiles en múltiples contextos patológicos en los que estas citoquinas están implicadas. Se pueden citar a título de ejemplo, las infecciones, las enfermedades autoinmunes, los rechazos de injerto, y en general todas las enfermedades relacionadas con una reacción inflamatoria tales como las alergias. Los anticuerpos y las composiciones que los comprenden son útiles para luchar contra este tipo de desórdenes y además son fáciles de obtener.

45 La invención describe un procedimiento de alto rendimiento para la obtención de anticuerpos humanos que neutralizan la actividad biológica de una citoquina humana seleccionada de entre VEGF, IFN α , IL-4, TNF α y TGF β , que comprende por lo menos una etapa (a) durante la cual se purifican:

- (i) las inmunoglobulinas contenidas en el suero de un individuo, o
- (ii) las inmunoglobulinas producidas por unas células B de un individuo,

50 siendo dicho individuo previamente inmunizado contra dicha citoquina, con un producto inmunógeno tal como se ha descrito en la solicitud de patente francesa nº FR 0211455 presentada el 16 de septiembre de 2002. Dicho producto es un producto inmunógeno estable que comprende unos heterocomplejos inmunógenos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas, seleccionadas de entre VEGF, IFN α , IL-4, TNF α y TGF β , y (ii) unas moléculas proteicas portadoras en las que menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) mediante un enlace covalente.

El VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), así como la IL-4 (Interleukine 4), el IFN α (interferón α), el TNF α (Tumor Necrosis Factor α) y el TGF β (Transforming Growth Factor β), se designarán a veces con el término genérico “citoquina de interés” en la continuación de la descripción.

5 Preferentemente, los anticuerpos consisten en unos anticuerpos “neutralizantes” o “bloqueantes”. Un anticuerpo “neutralizante” o un anticuerpo “bloqueante” se define, según la invención, como un anticuerpo cuya fijación sobre la citoquina diana bloquea la actividad biológica de esta citoquina, que es el principal objetivo buscado por la invención, cuando la citoquina contra la que están dirigidos los anticuerpos posee una actividad biológica deletérea para el organismo.

10 La obtención previa de una inmunización del individuo contra la citoquina de interés se detecta, tal como se ilustra en los ejemplos, en particular mediante un título elevado de anticuerpos anti-citoquina en el suero de los individuos inmunizados. Se ha observado que unos anticuerpos naturales humanos que neutralizan la actividad deletérea de una citoquina de interés se obtienen en todos los individuos inmunizados.

15 Sin estar vinculado por cualquier teoría, los inventores piensan que los anticuerpos naturales humanos anti-citoquina descritos, son unos anticuerpos de alta afinidad. En otras palabras, según los inventores, los complejos formados entre dichos anticuerpos y la citoquina contra la cual están dirigidos, no se desasocian o muy difícilmente, lo cual provoca una reducción drástica de la concentración circulante de citoquina libre en un individuo al que se le han administrado los anticuerpos definidos en la presente descripción.

20 Con mayor preferencia, el suero humano o las células B humanas que producen estos anticuerpos proceden de un individuo inmunizado con un producto inmunógeno tal como se ha descrito en la solicitud de patente francesa nº FR 0211455 presentada el 16 de septiembre de 2002. Dicho producto es un producto inmunógeno estable que comprende unos heterocomplejos inmunógenos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas, seleccionadas de entre IFN α , IL-4 y TNF α , y (ii) unas moléculas proteicas portadoras en las que menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) mediante un enlace covalente.

25 Mediante la expresión “proteína antigénica” se entiende una citoquina seleccionada de entre IFN α , IL-4 y TNF α , que si fuera necesario podría ser desactivada químicamente, o un fragmento de dicha citoquina de por lo menos 10 aminoácidos de longitud, susceptible de ser reconocido específicamente por los receptores para el antígeno expresado por los linfocitos B de un organismo hospedante, humano o animal, particularmente cualquier mamífero, proteína antigénica que, una vez incluida en un producto inmunógeno, estimula la producción de anticuerpos que reconocen dicha citoquina.

30 La proteína de interés antigénica puede consistir asimismo en un homo-oligómero u homo-polímero de dicha citoquina nativa o también en un homo-oligómero u homo-polímero de un fragmento peptídico de citoquina nativa. La proteína de interés antigénica puede consistir asimismo en un hetero-oligómero o en un hetero-polímero que comprende una combinación de varios fragmentos peptídicos distintos inicialmente incluidos en la citoquina nativa.

35 Mediante la expresión “molécula proteica portadora”, incluida en el producto inmunógeno, se entiende cualquier proteína o péptido de por lo menos 15 aminoácidos de longitud, sea cual sea su secuencia en aminoácidos, y que, asociándose de manera parcialmente covalente a las moléculas de antígeno de interés para formar los heterocomplejos proteicos constitutivos del producto inmunógeno, permite la presentación de un gran número de moléculas de antígeno de interés a los linfocitos B. Preferentemente, las moléculas proteicas portadoras serán del tipo KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

40 Preferentemente, el producto inmunógeno comprende además unos oligodesoxinucleótidos CpG a título de adyuvante que permiten aumentar la producción de anticuerpos que neutralizan la actividad de la citoquina de interés. La utilización de oligonucleótidos CpG como adyuvante de una composición inmunógena, para aumentar la respuesta inmunitaria se describe en los documentos siguientes: McCluskie MJ *et al.* 2000; Gallichan WS, *et al.*, 2001; y Eastcott JW *et al.*, 2001.

45 A título de ejemplo de producto inmunógeno estable que comprende unos heterocomplejos eficaces para inducir una inmunización que constituye el principio activo de la composición vacunal de la invención, se puede citar la asociación entre la molécula proteica portadora KLH (Keyhole limpet hemocyanin) y unas moléculas de IFN α humano, heterocomplejo designado a continuación con el término de IFN α -KLH. Los productos inmunógenos preferidos se seleccionan de entre los productos inmunógenos que comprenden los heterocomplejos siguientes, en los que las proteínas antigénicas (i) por un lado y la molécula portadora proteica (ii) por otro lado, son respectivamente:

a> (i) interferón alfa y (ii) KLH;

b> (i) IL-4 y (ii) KLH;

c> (i) TNF α y (ii) KLH;

55 El porcentaje de moléculas proteicas portadoras y de proteínas antigénicas de interés unidas entre sí por unos enlaces covalentes en un producto inmunógeno de la invención puede ser fácilmente verificado por el experto en la materia.

Por ejemplo, la determinación del porcentaje de moléculas de antígeno de interés unidas a las moléculas de proteína portadora por un enlace covalente en un producto inmunógeno de la invención puede ser realizada según el protocolo descrito en el ejemplo 10.

5 A título ilustrativo, el producto inmunógeno que comprende unos heterocomplejos entre la molécula proteica portadora KLH (Keyhole limpet hemocyanin) y unas moléculas de interferón alfa humano, sólo el 3% de las moléculas de interferón alfa están unidas de manera covalente a la molécula proteica portadora KLH.

El producto inmunógeno que comprende unos heterocomplejos inmunógenos tales como se han definido anteriormente que constituye el principio activo de una composición vacunal según la invención, puede ser preparado según las etapas siguientes:

- 10 a) incubar las proteínas antigénicas (i) y la molécula portadora (ii) en una relación molar (i):(ii) de 5:1 a 50:1, en presencia de un agente químico de unión;
- b) recuperar el producto inmunógeno que comprende los heterocomplejos inmunógenos preparado en la etapa a);

Preferentemente, el agente químico de unión es el glutaraldehído.

15 Muy preferentemente, el procedimiento está además caracterizado porque la etapa a) está seguida de una etapa de estabilización del producto que comprende los heterocomplejos inmunógenos por el formaldehído, previamente a la etapa b) de recuperación de los heterocomplejos.

Preferentemente, cuando el glutaraldehído se utiliza como agente químico de unión, éste está presente en el medio de reacción de acoplamiento a una concentración final comprendida entre 0,002 M y 0,03 M, preferentemente a la concentración final de 0,026 M.

La reacción de acoplamiento con el glutaraldehído se realiza ventajosamente, durante 20 minutos a 60 minutos, preferentemente 30 minutos, a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C.

25 Después de la etapa de acoplamiento, el glutaraldehído en exceso se elimina, por ejemplo mediante diálisis con la ayuda de una membrana de diálisis con un umbral de corte de 3 kDa. La etapa de diálisis se lleva a cabo ventajosamente a 4°C, en un tampón ajustado a pH 7,6.

30 Para estabilizar el producto que comprende los heterocomplejos proteicos preparado en la etapa a), dicho producto puede ser tratado en disolución por el formaldehído, por ejemplo por formaldehído a la concentración final de 3 mM. La reacción de estabilización tiene ventajosamente una duración comprendida entre 12 y 48 horas, preferentemente entre 20 y 30 horas y es de manera muy particularmente preferida de una duración de 24 horas. La reacción de estabilización por el formaldehído está ventajosamente detenida mediante la adición de glicina, preferentemente a la concentración de 0,1 M, durante 1 hora y a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C.

La adición de oligodesoxinucleótidos CpG interviene preferentemente después de la etapa de eliminación del exceso de glutaraldehído.

35 La preparación de una composición vacunal que comprende un producto inmunógeno que comprende unos heterocomplejos inmunógenos, tales como se han definido anteriormente, se ilustra además en los ejemplos 1, 2, 3 y 4.

Típicamente, los anticuerpos naturales humanos neutralizantes que se describen neutralizan por lo menos el 50% del máximo de la actividad biológica de la citoquina de interés *in vitro*.

40 Por ejemplo, se ha mostrado que la inhibición *in vitro* de por lo menos el 50% del máximo de la actividad biológica de una citoquina de interés se obtiene habitualmente con una cantidad de anticuerpos naturales humanos neutralizantes comprendidos entre 10^{-3} µg y 10^{-2} µg.

El máximo de actividad biológica de la citoquina de interés *in vitro* está preferentemente inducido, respectivamente, por:

- i. la cantidad mínima de IFN α que provoca el máximo de inhibición de la lisis de las células de la línea MDBK por el virus de la estomatitis vesicular (VSV);
- 45 ii. la cantidad mínima de IL-4 que provoca el máximo de proliferación de la línea celular TF-1 dependiente de la IL-4;
- iii. la cantidad mínima de TNF α que provoca el máximo de proliferación de la línea celular L929 dependiente del TNF α .

Los ensayos de actividad biológica del IFN α humano, de la IL-4 y del TNF α pueden ser llevados a cabo en particular según el protocolo descrito respectivamente en los ejemplos 6, 7 y 8.

Preferentemente, el procedimiento descrito comprende una etapa (b) de purificación de las inmunoglobulinas de isotipo G a partir de la fracción de inmunoglobulinas obtenidas al final de la etapa (a).

5 El procedimiento descrito es particularmente ventajoso porque permite obtener un alto nivel de respuesta de anticuerpos, y una fuerte proporción de células B circulantes que producen unos anticuerpos que neutralizan la actividad de la citoquina de interés. La población de linfocitos B aislada puede ser directamente utilizada, por ejemplo fusionando estos linfocitos B con unas células de mieloma para producir los anticuerpos naturales humanos anti-citoquina, lo cual evita los complejos de purificación. El procedimiento descrito permite por ejemplo evitar recurrir a unos métodos de purificación de las células B tales como el "panning", el filtrado a través de las columnas que contienen unos anticuerpos acoplados al nylon o también la selección por citometría de flujo (FACS®).

10 La obtención de las células B a partir del individuo inmunizado es simple. Un primer método consiste en aislar los linfocitos B a partir de la sangre periférica, mediante centrifugación en un gradiente de densidad constituido por una mezcla de polímeros polisacarídicos (Ficoll®) y de metrizamida, un compuesto yodado denso. Se obtiene en la interfaz una población de linfocitos B separada de los glóbulos rojos y de la mayoría de los polinucleares.

15 Otro método de obtención de las células B a partir del individuo inmunizado, consiste en aislar los linfocitos B a partir de los tejidos y, en particular, a partir de los órganos linfoides tales como el bazo, el timo, la médula ósea, los ganglios o los tejidos linfoides asociados a las mucosas, tales como las amígdalas palatinas.

El procedimiento descrito puede comprender eventualmente una etapa ulterior suplementaria de obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos que neutralizan la actividad biológica de la citoquina.

20 El procedimiento descrito puede comprender asimismo una etapa ulterior suplementaria de obtención de fragmentos F(ab) o F(ab)'₂ que neutralizan la actividad biológica de la citoquina.

Dicho procedimiento puede asimismo comprender las etapas adicionales siguientes:

(i) fusionar las células B obtenidas al final de la etapa (a) con unas células de un mieloma, con el fin de obtener una línea de hibridomas, y

(ii) recuperar los anticuerpos producidos por los hibridomas.

25 El conjunto de estas etapas se describirá con mayor detalle en la continuación de la descripción haciendo referencia a las composiciones farmacéuticas.

30 Se describe asimismo una composición farmacéutica caracterizada porque comprende, a título de principio activo, unos anticuerpos naturales humanos de isotipo Ig4, que neutralizan la actividad de una citoquina humana seleccionada de entre VEGF, IFN α , IL-4, TNF α y TGF β , inhibiendo dichos anticuerpos neutralizantes por lo menos el 50% del máximo de actividad biológica inducida por dicha citoquina *in vitro*.

Tal como se desprende de la presente descripción, los anticuerpos naturales humanos contenidos en la composición farmacéutica, tal como se ha definido anteriormente, se obtienen a partir del suero o de las células B que proceden de un individuo previamente inmunizado contra dicha citoquina de interés, con la ayuda de la composición vacunal de la invención.

35 Típicamente, estos anticuerpos naturales humanos inhiben *in vitro* por lo menos el 50% de la actividad biológica inducida por una cantidad comprendida entre 0,006 ng y 0,5 ng de dicha citoquina de interés.

40 Por ejemplo, se ha mostrado que la inhibición *in vitro* de por lo menos el 50% del máximo de la actividad biológica de dicha citoquina de interés, por ejemplo cuando esta citoquina se utiliza en las cantidades especificadas anteriormente, se obtiene habitualmente con una cantidad de anticuerpos naturales humanos neutralizantes anti-citoquina comprendida entre 10⁻³ μ g y 10⁻² μ g.

45 Preferentemente, dichos anticuerpos naturales humanos neutralizantes se obtienen a partir del suero o de células B de un individuo inmunizado con la composición vacunal según la invención que comprende, a título de principio activo, un producto inmunógeno estable que comprende unos heterocomplejos inmunógenos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas, seleccionadas respectivamente de entre IFN α , IL-4 y TNF α , y (ii) unas molécula proteicas portadoras en las que menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) mediante un enlace covalente.

50 Mediante la expresión "anticuerpos naturales" se entienden exclusivamente los anticuerpos tal como están producidos naturalmente por el individuo inmunizado específicamente contra la citoquina de interés, estando dichos anticuerpos naturales contenidos en el suero de la sangre de este individuo, o estando estos anticuerpos naturales producidos, después de la inmunización, por las células B activadas de este individuo.

La definición de los heterocomplejos, su obtención, la determinación del porcentaje de unión de las proteínas antigénicas con las proteínas portadoras, pueden ser llevados cabo según unas técnicas idénticas a las que se han descrito haciendo referencia al procedimiento de la invención.

Preferentemente, el máximo de actividad biológica de dicha citoquina *in vitro* está inducido, respectivamente, por:

- (i) 0,5 ng de VEGF
- (ii) 0,006 ng de IFN α
- (iii) 0,5 ng de IL-4

5 Los anticuerpos naturales humanos neutralizantes anti-citoquina especificados en la presente descripción son unos anticuerpos policlonales o monoclonales.

Preferentemente, los anticuerpos policlonales se seleccionan de entre:

- (i) una fracción total de anticuerpos purificados a partir del suero de un ser humano inmunizado contra dicha citoquina humana;
- 10 (ii) una fracción purificada de anticuerpos policlonales monoespecíficos que neutralizan la actividad de dicha citoquina;
- (iii) los fragmentos Fab o F(ab) $'_2$ preparados a partir de los anticuerpos policlonales (i) y (ii) anteriores.

La obtención de una fracción total de anticuerpos (i) purificados a partir del suero de un ser humano inmunizado contra dicha citoquina humana comprende preferentemente las etapas siguientes:

- 15 a. inyectar una composición inmunógena, preferentemente tal como se ha descrito anteriormente, a un ser humano,
- b. recuperar el inmunosuero de este ser humano, que contiene los anticuerpos que neutralizan la actividad del antígeno administrado,
- 20 c. purificar una fracción de anticuerpos a partir del inmunosuero.

25 Cada una de estas etapas se describe con mayor detalle a continuación. La recuperación del inmunosuero se realiza de manera conocida por el experto en la materia, por ejemplo mediante la separación del suero por centrifugación de una muestra de sangre total. La purificación de una fracción de anticuerpo a partir del inmunosuero de un paciente inmunizado se lleva a cabo, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía intercambiadora de iones, filtración sobre gel, cromatografía sobre columna de proteína A/G, cromatografía de afinidad o cromatografía de inmunoafinidad.

30 Una etapa suplementaria de purificación de los anticuerpos, particularmente bien adaptada se describe en la solicitud de patente EP 662 480. Este método permite suprimir los anticuerpos anti-proteína portadora en el seno de una mezcla de anticuerpos, y en particular en el seno del inmunosuero obtenido en la etapa (b).

Una fracción purificada de anticuerpos policlonales monoespecíficos (ii) que neutraliza la actividad de la citoquina de interés puede ser obtenida realizando una cromatografía de afinidad a partir de una fracción total de anticuerpos (i) purificados a partir del inmunosuero de un ser humano inmunizado contra dicha citoquina humana, fijando un motivo antigénico de la citoquina de interés sobre la columna.

35 La purificación de los fragmentos F(ab) $'_2$ a partir de los anticuerpos policlonales descritos anteriormente o a partir del inmunosuero o del plasma sanguíneo puede ser llevada a cabo según el método descrito en la solicitud de patente US 2002/0164327, que comprende una etapa de digestión del plasma sanguíneo o del suero por la pepsina, y unas etapas de separación y de purificación hasta obtener unos fragmentos F(ab) $'_2$, desprovistos de albúmina, de anticuerpos completos y sustancialmente desprovistos de sustancias pirógenas.

40 El aislamiento de las fracciones F(ab) y F(ab) $'_2$ permite obtener unas ventajas específicas, tales como el hecho de fijarse a las citoquinas de interés sin interactuar por ello con otras moléculas efectoras del sistema inmunitario.

Los fragmentos F(ab) se pueden obtener mediante un método similar, que consiste en digerir el inmunosuero, el plasma o las fracciones purificadas de anticuerpos policlonales (i), (ii) y (iii) que proceden de un ser humano inmunizado contra una citoquina de interés, por la papaína.

45 Alternativamente, los anticuerpos son monoclonales y se seleccionan de entre:

- (i) unos anticuerpos producidos por unas células procedentes de la fusión celular entre (a) unas células B de un ser humano inmunizado contra dicha citoquina humana y (b) unas células de una línea productora de anticuerpos, tales como unas células de un mieloma;

(ii) unos anticuerpos producidos por una células transfectadas o transformadas con un ADN que codifica una inmunoglobulina, siendo dicho ADN previamente aislado a partir del ADN de una célula B de un ser humano inmunizado contra dicha citoquina humana; según una característica particular, dicha inmunoglobulina reproduce los anticuerpos inducidos por la inmunización y que están presentes en el suero de los pacientes inmunizados.

(iii) los fragmentos Fab o $F(ab)'_2$ preparados a partir de los anticuerpos policlonales (i) y (ii) anteriores;

(iv) unos fragmentos ScFv.

Los anticuerpos monoclonales (i) pueden ser obtenidos de la manera siguiente:

La primera etapa consiste en aislar los linfocitos B a partir de un ser humano inmunizado contra una citoquina humana. Un primer método consiste en aislar los linfocitos B a partir de la sangre periférica, mediante centrifugación en un gradiente de densidad constituido por una mezcla de polímeros polisacarídicos (Ficoll[®]) y de metrizamida, un compuesto yodado denso. Se obtiene en el interfaz una población de células mononucleares separada de los glóbulos rojos y de la mayoría de los polinucleares. La población de linfocitos B puede después ser fusionada con una célula de mieloma o sufrir una etapa de purificación suplementaria facultativa, mediante el método de "panning", es decir, mediante la fijación a un soporte recubierto de anticuerpos que permiten una adherencia específica de los linfocitos B. Las células pueden asimismo ser filtradas a través de las columnas que contienen unos anticuerpos acoplados al nylon que recubre lana de acero, lo cual permite la elución de diferentes poblaciones celulares, incluyendo los linfocitos B. Estas técnicas pueden constituir una etapa previa a una selección mediante FACS[®] que proporciona unas poblaciones celulares altamente purificadas.

Otro método consiste en aislar los linfocitos B a partir de los tejidos y en particular a partir de los órganos linfoides tales como el bazo, el timo, la médula ósea, los ganglios, o los tejidos linfoides asociados a las mucosas, tales como las amígdalas palatinas. En caso de respuesta inmune local, los linfocitos pueden ser aislados del sitio en sí de la reacción.

Los linfocitos así aislados son después fusionados con unas células de mieloma, y las células híbridas o hibridomas son después seleccionados en función de su afinidad con la citoquina de interés y los hibridomas que producen un anticuerpo de especificidad deseada son después identificados y clonados mediante transplante. Los anticuerpos producidos por dichos hibridomas, que producen los anticuerpos de alta afinidad hacia la citoquina de interés, constituyen la fracción de anticuerpos monoclonales (i).

Un tipo particular de linfocito B puede asimismo ser aislado mediante cultivo en dilución límite, y seleccionado en función de la aptitud de los anticuerpos que produce para unirse a la citoquina de interés, antes de ser fusionado con unas células de mieloma.

El ADN que procede de un linfocito B o de un hibridoma seleccionado por su capacidad para producir unos anticuerpos de alta afinidad con una citoquina puede ser después aislado, y las secuencias de ADN que codifican para el anticuerpo pueden ser amplificadas según unas técnicas clásicas en biología molecular. El ADN así amplificado se inserta después en unas células que permiten la expresión de los anticuerpos del linfocito B seleccionado. Los anticuerpos así producidos constituyen la fracción (ii).

Los fragmentos $F(ab)$ y $F(ab)'_2$ (ii) pueden ser aislados según un método enzimático idéntico al descrito anteriormente para los anticuerpos policlonales.

Los fragmentos scFv (iv) o "Single chain Variable Fragment" pueden ser sintetizados de la siguiente manera:

Las secuencias de ADN que codifican para el dominio variable de una cadena pesada y el dominio variable de una cadena ligera son seleccionadas a partir del ADN de un linfocito B o de un hibridoma tal como se ha descrito anteriormente. Esta selección puede intervenir seleccionando unos cebadores específicos, según unas técnicas clásicas de biología molecular. Dichas secuencias de ADN son después clonadas en un vector de expresión, con una secuencia que codifica un péptido sintético cuyo papel es unir los dominios variables.

El vector de expresión se inserta a continuación en una célula hospedante. Se proporcionan a continuación unos ejemplos de vectores de expresión y de células hospedantes adaptadas a la expresión de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos. Se puede citar a título de ejemplo de células hospedantes, bien adaptadas a la síntesis de fragmento scFv, las células L-form de *Proteus mirabilis* tal como se ha descrito por Rippmann *et al.* (1998).

La síntesis de fragmentos scFv permite obtener unas ventajas específicas debido al pequeño tamaño de estos fragmentos, que les permite extenderse fácilmente por los tejidos.

Es asimismo posible sintetizar unos fragmentos Fab y $F(ab)'_2$, según el método descrito anteriormente haciendo referencia a los fragmentos scFv.

Aunque no constituye un modo de realización preferido de la invención, los anticuerpos naturales humanos neutralizantes anti-citoquina especificados en la presente descripción pueden ser recombinantes. En este caso, los

fragmentos de ADN procedentes de un linfocito B o de un hibridoma seleccionado según el método descrito anteriormente, sufren unas modificaciones. En particular, el ADN que codifica para los dominios variables del anticuerpo, y en particular para los dominios variables de las cadenas pesadas (VH) y de las cadenas ligeras (VL) puede ser mutado de manera aleatoria, para aumentar la afinidad de los fragmentos frente a una citoquina de interés.

5 Los dominios variables pueden asimismo ser mutados en la región CDR3 según un procedimiento análogo a la mutación somática responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante la respuesta inmune natural. La maduración de la afinidad *in vitro* puede ser realizada amplificando las secuencias que codifican los dominios VH y VL mediante polimerización por reacción en cadena (PCR) utilizando unos cebadores complementarios de las regiones CDR3, que contienen unas mutaciones aleatorias, de manera que unos dominios VL y VH amplificados sean mutados. Estos dominios son después nuevamente cribados frente a su capacidad para unirse a la citoquina de interés, y se seleccionan los dominios que presentan la afinidad más importante para la citoquina. El ADN que codifica para los dominios VL y VH se sustituye después o bien en el seno de las secuencias que codifican las regiones constantes del anticuerpo del que proceden, o bien en el seno de las secuencias que codifican las regiones constantes de cualquier inmunoglobulina.

15 Las secuencias de ADN así obtenidas, que codifican para unos anticuerpos recombinantes completos o para unos fragmentos de tipo scFv o unos dominios VH o VL son después introducidas en unos vectores de expresión y en células hospedantes, cuyos ejemplos se proporcionan a continuación.

Otros anticuerpos pueden ser obtenidos gracias a un cribado a través de un banco de fagos de expresión, preparado utilizando unos ADNc que codifican para dominios VL y VH, siendo estos ADNc preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Los métodos de preparación de estos bancos son conocidos. A título de ejemplo de banco de fago de expresión, se puede citar el "Recombinant Phage Antibody System" comercializado por Pharmacia. Unos ejemplos de realización y de cribado de bancos de fago de expresión se proporcionan en la patente US nº 5.223.409 y en la solicitud internacional PCT WO 92/20791.

25 En un modo de realización, unos anticuerpos monoclonales humanos anti-citoquina tales como se han descrito anteriormente son utilizados para seleccionar unos dominios VH y VL que tienen unas propiedades de unión a las citoquinas similares. Esta selección se efectúa por ejemplo mediante el método del "epitope imprinting", el método de la selección guiada o mediante los métodos descritos en la solicitud internacional PCT WO 93/06213. Los bancos de anticuerpos utilizados en este método son preferentemente unos bancos scFv.

30 Una vez que los dominios VH y VL están seleccionados, se mezclan y después se criban en función de su capacidad para unirse a una citoquina seleccionada. La secuencia de ADN que codifica los pares de dominios VH y VL puede después ser mutada de manera aleatoria, para aumentar su afinidad frente a la citoquina seleccionada. Los pares de dominios VH y VL pueden asimismo ser mutados en la región CDR3 según un procedimiento análogo a la mutación somática responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante la respuesta inmune natural. La maduración de la afinidad *in vitro* puede ser realizada según el método descrito anteriormente, haciendo referencia al ADN de un linfocito B seleccionado por su capacidad para unirse a una citoquina. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL seleccionados pueden después ser comparadas con las secuencias de aminoácidos correspondientes de las líneas germinales debido a que pueden aparecer unas diferencias de secuencia, que se deben por ejemplo al tipo de banco que sirvió para el primer cribado. En este caso, puede ser útil realizar unas mutaciones "inversas" en las secuencias de ADN correspondientes para encontrar la secuencia inicial de aminoácidos. Dichas mutaciones inversas pueden ser realizadas mediante unos métodos clásicos en biología molecular, que permiten introducir unas mutaciones específicas, se trata por ejemplo de la mutagénesis *in situ* dirigida.

45 Después de dicha selección, los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de interés pueden ser clonados en unos vectores de expresión según unas técnicas conocidas. Los ácidos nucleicos pueden sufrir asimismo una etapa de manipulación suplementaria que consiste en crear otros anticuerpos, por ejemplo añadiendo unas secuencias que codifican para unos dominios de inmunoglobulinas suplementarias, tales como unas regiones constantes adicionales.

Las secuencias de ADN que codifican los anticuerpos recombinantes o las fracciones de anticuerpo, y en particular los dominios VH y VL pueden ser introducidas en una línea celular apropiada, tales como unas células de mieloma no productoras de anticuerpos utilizadas para los hibridomas, con el fin de producir los anticuerpos recombinantes seleccionados por su capacidad para unirse a una citoquina de interés. Estas secuencias de ADN pueden asimismo ser clonadas en un vector de expresión recombinante introducido en una célula hospedante de mamífero, tal como se describe a continuación.

55 Los hospedantes celulares preferidos son las células CHO (Chinese Hamster Ovary), las células de mieloma NS0, las células COS y las células SP2. Cuando unos vectores de expresión que comprenden las secuencias que codifican para los anticuerpos, los anticuerpos recombinantes y los fragmentos de anticuerpos están introducidos en las células hospedantes, estas células son cultivadas durante unos periodos suficientemente largos para que los anticuerpos o los fragmentos puedan ser producidos en los hospedantes celulares o estar mejor segregados en el medio de cultivo en el que se disponen las células hospedantes. Los anticuerpos se recuperan después mediante unas técnicas estándar de purificación de las proteínas.

Composiciones farmacéuticas y administración

5 Unas composiciones especificadas en la presente invención incluyen unas composiciones farmacéuticas que comprenden unos anticuerpos naturales humanos neutralizantes anti-citoquina o tales como los descritos anteriormente, incluyendo unos fragmentos de anticuerpos. Dicha composición comprende además por lo menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

10 La expresión "excipiente fisiológicamente aceptable" incluye por ejemplo los disolventes, los medios de dispersión, los agentes antibacterianos, los agentes anti-fúngicos o también los agentes de dilución que permiten alcanzar la isotonía. Entre estos excipientes según la invención, se pueden citar en particular el agua, los tampones fosfato, la dextrosa, el glicerol, el etanol y sus combinaciones. Frecuentemente, es preferible añadir a la composición unos agentes isotónicos, tales como unos azúcares, unos polialcoholes, por ejemplo manitol o sorbitol o también el cloruro de sodio. La composición puede comprender además unas sustancias auxiliares, tales como unos emulsificantes, unos conservantes o unos tampones que aumentarán la eficacia o la duración de utilización de estas composiciones.

15 Las composiciones anteriores pueden tener varias formas, y pueden estar por ejemplo en forma líquida o en forma de dosis inyectables sólidas o semi-sólidas, destinadas a ser infundidas antes de la inyección. Son posibles otras formas, tales como por ejemplo las suspensiones, las dispersiones, los comprimidos, los polvos, los liposomas o también los supositorios. Las composiciones preferidas están en forma de disoluciones inyectables, similares a las que existen en referencia a la vacunación pasiva de los seres humanos, con otros anticuerpos diferentes de los descritos en la presente solicitud. El modo de administración preferido de las composiciones es el modo parenteral (por ejemplo subcutáneo o intramuscular) o intravenoso.

20 Las composiciones anteriores deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y de almacenamiento habituales. Estas composiciones pueden ser unas disoluciones, unas microemulsiones, unas dispersiones, unos liposomas u otras estructuras. La preparación de composiciones inyectables estériles puede llevarse a cabo incorporando el principio activo, es decir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en una cantidad apropiada de disolvente y de otros excipientes, tales como se han descrito anteriormente, y después realizando una esterilización mediante filtración.

25 Se puede prever eventualmente que la composición anterior comprenda un primer tipo de anticuerpos, tales como los descritos anteriormente, que neutralizan la actividad de una citoquina y un segundo tipo de anticuerpos dirigidos por ejemplo contra unos receptores o unas dianas conocidas de dicha citoquina.

30 Teniendo en cuenta el pleiotrópico de las citoquinas, y en particular su papel en la reacción inflamatoria y en la respuesta a las infecciones, puede ser ventajoso combinar una composición anterior con un principio activo suplementario, implicado en la lucha contra la inflamación, la infección, el asma o también los rechazos de injertos, o las enfermedades autoinmunes.

Unos ejemplos de agentes terapéuticos de lucha contra la inflamación, que pueden ser utilizados en combinación con los anticuerpos de la invención, son:

35 El budenósido, los corticosteroides, la ciclosporina, la sulfasalazina, los aminosalicilatos, la 6-mercaptopurina, la azatioprina, el metronidazol, los inhibidores de la lipoxigenasa, la mesalamina, la olsalazina, la balsalazida, los antioxidantes, los inhibidores del tromboxano, los antagonistas de los receptores al IL-1, los anticuerpos monoclonales anti IL-1 β , los anticuerpos monoclonales anti IL-6, los inhibidores de elastasa, los receptores del complemento de tipo 1 en forma soluble, y otros.

40 Unos ejemplos de agentes terapéuticos de lucha contra la infección, que pueden ser utilizados en combinación con los anticuerpos de la invención son: los antibióticos, los quelantes del hierro, la apolipoproteína 1 reconstituida con unos lípidos, unos ácidos hidroxámicos (agentes antibacterianos sintéticos).

45 Las composiciones farmacéuticas anteriores pueden incluir "una cantidad farmacéutica eficaz" de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo según la invención. Mediante la expresión "cantidad farmacéutica eficaz" se entiende una cantidad eficaz, a dosificaciones y para una duración suficiente que permite llegar al resultado terapéutico perseguido. Esta cantidad varía en función de factores tales como el estado patológico, el sexo, el peso, la edad del paciente a tratar, y de la capacidad del anticuerpo para inducir un efecto en el paciente. Dicha cantidad conlleva efectos secundarios o tóxicos inferiores a los beneficios que puede aportar el tratamiento por la composición anterior.

50 La posología debe ser adaptada con el fin de obtener una respuesta óptima. Por ejemplo la composición farmacéutica puede ser administrada en una sola toma o en varias tomas a intervalos de tiempo regulares.

Utilizaciones

55 Debido a la capacidad de los anticuerpos contenidos en las composiciones según la invención para unirse a las citoquinas, los anticuerpos especificados en la presente descripción pueden ser utilizados para detectar unas citoquinas *in vitro*, utilizando unas técnicas clásicas tal como la cromatografía de afinidad, las técnicas de tipo "ELISA" (enzyme linked immunosorbent assays) o también "RIA" (radioimmunoassay).

Se describe asimismo un método de detección de una citoquina en una muestra, que comprende una etapa de puesta en contacto de la composición de la invención con la muestra a analizar y una etapa de detección de un complejo formado entre el anticuerpo y una citoquina.

5 Para facilitar la detección de un complejo, el anticuerpo puede ser marcado por una sustancia detectable, por ejemplo unas enzimas tales como la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o también la acetilcolina esterasa, unos grupos proestéticos tales como los pares estreptavidina/biotina, y avidina/biotina, unas moléculas fluorescentes tales como la ombeliferona, la fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina o unas moléculas radiactivas, tales como ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H .

10 Se describe asimismo un método de detección de la presencia y de la cantidad de una citoquina en una muestra de composición desconocida mediante dosificación por inhibición competitiva. Este método utiliza unos anticuerpos tales como se especifican en la presente descripción y una citoquina de referencia, marcada.

15 Según este método de dosificación, se combinan la muestra biológica, la citoquina de referencia marcada y el anticuerpo según la invención, y se determina la cantidad de citoquina de referencia unida al anticuerpo. La cantidad de citoquina de la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de citoquina de referencia unida al anticuerpo de la invención.

Se describe asimismo:

- La utilización de los anticuerpos anti-VEGF para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer.
- 20 ▪ La utilización de los anticuerpos anti-IFN α para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del estado de inmunosupresión.
- La utilización de los anticuerpos anti-IL-4 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la alergia.
- La utilización de los anticuerpos anti-TNF α para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento del estado de inmunosupresión.
- 25 ▪ La utilización de los anticuerpos anti-TGF β para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la infección por un retrovirus o al tratamiento de un cáncer seleccionado de entre el cáncer de colon, el cáncer de mama y el cáncer de próstata.

Método de tratamiento

30 De manera preferida, la composición de anticuerpos especificada en la presente descripción se integra en el marco de una vacunación anti-citoquina como previa a una vacunación convencional cuyo objetivo es neutralizar o bloquear los efectos inmunotóxicos del estroma, y permitir el desarrollo normal de la reacción inmunitaria adaptada contra un agresor antigénico.

Se describe asimismo un método de tratamiento que comprende por lo menos las etapas siguientes:

- 35 (i) administrar a un paciente una composición de anticuerpos tal como se especifica en la presente descripción,
- (ii) administrar a dicho paciente una composición inmunógena que contiene un antígeno o una combinación de antígenos que inducen la respuesta inmunitaria buscada, contra dicho antígeno o dicha combinación de antígenos.

40 Este método en dos etapas permite restablecer la respuesta inmunitaria de un paciente, antes de que éste esté vacunado contra el agente responsable de la inmunodepresión.

EJEMPLO 1: Heterocomplejo KLH-VEGF humano

Este heterocomplejo es apropiado para inducir principalmente en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan el VEGF humano.

45 Se disuelven 0,58 mg de proteína KLH en 0,5 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. A esta disolución se añade 1 mg de VEGF humano disuelto en 1 ml del mismo tampón.

La mezcla de proteína así obtenida se trata mediante glutaraldehído a la concentración final de 0,026 M durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El exceso de glutaraldehído se elimina después mediante 3 diálisis sucesivas de 2 horas cada una, efectuadas en un filtro de diálisis cuyo umbral de corte es de 3 kDa, a 4°C, contra 200 ml de tampón de fosfato pH 7,6, 10 mM.

La mezcla se trata entonces mediante formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 48 horas. Después, la reacción se detiene mediante adición de glicina 0,1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

EJEMPLO 2: Preparación de un heterocomplejo KLH-IFN α

5 Este conjugado es apropiado para inducir principalmente en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan el IFN α humano.

Se disuelven 0,625 mg de proteína IFN α en 0,6 ml de tampón de fosfato 10 mM pH 8,5. A esta disolución se añade 1 mg de proteína IFN α humana disuelto en 1 ml del mismo tampón.

10 La mezcla de proteína así obtenida se trata mediante glutaraldehído a la concentración final de 0,026 M durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El exceso de glutaraldehído se elimina después mediante 3 diálisis sucesivas de 2 horas cada una, efectuadas en un filtro de diálisis cuyo umbral de corte es de 3 kDa, a 4°C, contra 200 ml de tampón de fosfato pH 7,6, 10 mM.

15 La mezcla se trata entonces mediante formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 48 horas. Después, la reacción se detiene mediante adición de glicina 0,1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

EJEMPLO 3: Preparación de un heterocomplejo KLH-IL4 humano

Este heterocomplejo es apropiado para inducir principalmente en la persona vacunada la producción de anticuerpos que neutralizan la IL4 humana.

20 Se disuelve 1 mg de proteína KLH en 1 ml de tampón de fosfato 10 mM pH 8,5. A esta disolución se añade 1 mg de proteína IL4 murina disuelto en 1 ml del mismo tampón.

La mezcla de proteína así obtenida se trata mediante glutaraldehído a la concentración final de 0,026 M durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El exceso de glutaraldehído se elimina después mediante 3 diálisis sucesivas de 2 horas cada una efectuadas en un filtro de diálisis cuyo umbral de corte es de 3 kDa, a 4°C, contra 200 ml de tampón de fosfato pH 7,6, 10 mM.

25 La mezcla se trata entonces mediante formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 24 horas. Después, se detiene la reacción mediante adición de glicina 0,1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

EJEMPLO 4: Preparación de un heterocomplejo KLH-TNF α murino

30 Este conjugado es apropiado para inducir principalmente en la persona vacunada la producción de anticuerpos que neutralizan el TNF α murino.

Se disuelven 0,625 mg de proteína KLH en 0,6 ml de tampón borato 10 mM pH 8,8 150 mM NaCl. A esta disolución se añade 1 mg de proteína IFN α humana disuelto en 1 ml del mismo tampón.

La mezcla de proteína así obtenida se trata mediante glutaraldehído a la concentración final de 0,026 M durante 45 minutos a temperatura ambiente.

35 El exceso de glutaraldehído se elimina después mediante 3 diálisis sucesivas de 4 horas cada una efectuadas en un filtro de diálisis cuyo umbral de corte es de 3 kDa, a 4°C, contra 200 ml de tampón de fosfato pH 7,6, 10 mM, 150 mM NaCl.

40 La mezcla se trata entonces mediante formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 48 horas. Y después se detiene la reacción mediante adición de glicina 0,1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

EJEMPLO 5: Ensayo de la actividad biológica del VEGF

45 Unas células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC) son cultivadas en unos pocillos de fondo plano de una placa de microcultivo a razón de 3.000 células por pocillo. Se depositan diferentes diluciones de anticuerpos sobre estas células endoteliales. El cultivo celular continúa a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 3 días. Se añaden 0,5 μ Ci de timidina tritiada/pocillo 18 horas antes del final de la incubación,.

Los anticuerpos neutralizantes impiden que el VEGF murino induzca la proliferación de las células endoteliales, mientras que los anticuerpos no neutralizantes permiten la proliferación de estas células.

EJEMPLO 6: Ensayo de actividad biológica del IFN α humano

5 Se cultivan unas células MDBK en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 350.000 células por pocillo. Diferentes diluciones de IFN α son después depositadas sobre las células MDBK. Después de 20 horas de cultivo celular realizado a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂, se retiran las diluciones presentes en los pocillos, se lavan las células y después se añaden 100 μ l que contienen 100 DL50 (dosis letal 50%) de virus VSV. Se mide el efecto lítico del virus 18 horas después de la adición del virus,.

Los anticuerpos neutralizantes permiten que el VSV lise las células, mientras que los anticuerpos no neutralizantes impiden esta lisis.

EJEMPLO 7: Ensayo de actividad biológica de IL-4 humana

10 Este ensayo utiliza las células TF-1, línea celular humana cuyo crecimiento es dependiente de IL4-humana (Kitamura, T. *et al.*, 1989. J. Cell. Physiol 140: 323-34). Unas células TF-1 son cultivadas en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 10.000 células por pocillo. Diferentes diluciones son después depositadas sobre las células TF-1. El cultivo celular continúa a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 3 días. Se añaden 0,5 μ Ci de timidina tritiada/pocillo 4 horas antes del final de la incubación.

15 Los anticuerpos neutralizantes impiden que la IL4 humana induzca la proliferación de las células TF-1, mientras que los anticuerpos no neutralizantes permiten la proliferación de estas células.

EJEMPLO 8: Ensayo de actividad biológica de TNF α

20 Unas células L929 son cultivadas en unos pocillos de fondo plano de una placa de microcultivo. Diferentes diluciones de TNF α son después depositadas sobre estas células. El cultivo celular continúa a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 3 días. Se añaden 5 mg/ml de MTT 4 horas antes del final de la incubación, (el MTT está disponible en la compañía SIGMA Chemical, St. Louis Mo.).

Los anticuerpos neutralizantes impiden que el TNF α induzca la muerte de las células endoteliales, a la inversa de los anticuerpos no neutralizantes.

EJEMPLO 9: Comparación de la actividad biológica de los anticuerpos según la invención y de los anticuerpos neutralizantes disponibles comercialmente

25

Ejemplo 9.1 Producción de un anticuerpo policlonal anti-interferón α (hu) en el ser humano

Un grupo de individuos voluntarios ha sido inmunizado mediante administración por vía intra-muscular de interferón α humano desactivado por un tratamiento químico a base de dimetilformamida. Cada individuo voluntario ha sufrido una inyección de 70 μ g de IFN α desactivado el D0, D7, D14, D21 y D42.

30 La curva de producción de los anticuerpos anti-interferón α ha sido determinada en función del tiempo. En el pico de producción (cuando el índice de inmunoglobulinas de isotipo IgG anti-IFN α generado era de aproximadamente 9,5 μ g/ml), 20 ml de sangre han sido extraídos en cada uno de los vacunados, y se ha constituido un conjunto de sueros. La actividad anti-interferón α del conjunto ha sido determinada mediante ELISA y su título encontrado es igual a 128.000 (a la inversa de la dilución que proporciona una DO = 0,300).

35 La fracción IgG ha sido aislada de una parte del conjunto de sueros mediante precipitación por el (NH₄)₂SO₄ al 35% de saturación. Después de la diálisis, la disolución de IgG que contiene los anticuerpos IgG que neutralizan la actividad de IFN α obtenido con un rendimiento del 80% ha presentado una actividad ELISA de 512.000.

40 El poder neutralizante (cantidad de anticuerpos que permite inhibir en 50% la actividad de 1 UI de interferón alfa humano) del suero entero anti-interferón α y de IgG que se deriva de éste se estableció a 0,004 μ g y 0,001 μ g, respectivamente.

Tabla 1

	Ac del ejemplo 9.1	Ac policlonal de conejo (1)	Ac policlonal ovino (2)	Ac monoclonal de ratón (3)
IFN α humano (1 UI)	0,04 μg	0,01 μ g	0,0005 μ g	0,8 μ g

45 La tabla 1 establece una comparación entre el poder neutralizante del anticuerpo policlonal anti-interferón α producido anteriormente con el poder neutralizante de anticuerpos comercializados. El poder neutralizante obtenido con el anticuerpo producido anteriormente es aproximadamente 200 veces superior al título obtenido con un anticuerpo monoclonal de ratón.

1. Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IFN α , disponible en la compañía PBL Biomedical Pharmaceutical con el nº de referencia 31100-1.

2. Anticuerpo policlonal ovino dirigido contra IFN α , disponible en la compañía PBL Biomedical Pharmaceutical con el nº de referencia 31130-1.

5 3. Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IFN α , disponible en la compañía PBL Biomedical Pharmaceutical con el nº de referencia 21105-1.

Ejemplo 9.2: Producción de un anticuerpo policlonal anti-IL4 en el ser humano

Un sujeto voluntario ha sido inmunizado mediante la administración intramuscular de un conjugado de KLH IL-4 humano.

10 El sujeto ha sufrido una inyección de 120 μ g de IL-4 humana desactivada químicamente por dimetilformamida el D0, D21 y D60.

15 La curva de producción de los anticuerpos anti-IL-4 ha sido determinada en función del tiempo. En el pico de síntesis de los anticuerpos (cuando el índice de inmunoglobulinas de isotipo IgG anti-IL4 generado era de aproximadamente 12 μ g/ml) se efectuó una extracción de sangre y se recogió el suero anti-IL-4. La medición mediante ELISA de la actividad del suero ha proporcionado un título de 512.000 (a la inversa de la dilución del suero que proporciona un valor en ELISA de 0,300. Después de la separación de la fracción IgG que contiene los anticuerpos anti-IL-4, la fracción ha sido digerida por la pepsina y el fragmento anticuerpo F(ab) $_2$ recogido con un rendimiento del 60%. La determinación de la actividad en ELISA ha proporcionado un valor de 310.000.

20 El poder neutralizante (cantidad de anticuerpos que permite inhibir en 50% la actividad de 0,5 ng de interleucina-4) del suero anti-IL-4 entero se establece a 0,02 μ g y para la fracción F(ab) $_2$ a 0,1 μ g.

Tabla 2

	Ac del ejemplo 9.2	Ac policlonal de cabra (1)	Ac policlonal de conejo (2)	Ac monoclonal de ratón (3)
IL-4 humana (0,5 ng)	0,02 μg	0,08 μ g	0,01 μ g	1 μ g

25 La tabla 2 establece una comparación entre el poder neutralizante del anticuerpo policlonal anti-IL-4 producido anteriormente con el poder neutralizante de los anticuerpos comercializados. El título obtenido con el anticuerpo producido anteriormente es aproximadamente 50 veces superior al título obtenido con un anticuerpo monoclonal de ratón.

1. Anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IL-4, disponible en la compañía R&D con el nº de referencia AF-204-NA.

30 2. Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IL-4, disponible en la compañía Peprtech con el nº de referencia 500-P24.

3. Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IL-4, disponible en la compañía R&D con el nº de referencia MAB204.

Ejemplo 9.3: Producción de un anticuerpo policlonal anti-VEGF murino en el ratón

35 Se utiliza un método parecido al descrito para los ejemplos 7.1 y 7.2. Un grupo de 20 ratones ha sido inmunizado mediante la administración de un heterocomplejo de KLH-VEGF murino. Cada ratón ha sufrido una inyección de 20 μ g de VEGF desactivado químicamente por dimetilformamida el D0, D7, D14, D21 y D42.

40 Haciendo referencia a la curva de producción de los anticuerpos anti-VEGF, se efectúa una extracción de sangre en todos los ratones en el pico de respuesta y se constituye un conjunto de sueros anti-VEGF. La fracción IgG ha sido aislada mediante precipitación por el (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ al 35% de saturación. La actividad ELISA ha sido determinada y es igual a 256.000, y la actividad neutralizante de la fracción IgG (cantidad de anticuerpos que permite inhibir en 50% la actividad de 0,5 ng de VEGF murino) a 0,012 μ g.

Tabla 3

	Ac del ejemplo 9.3	Ac policlonal de cabra (1)	Ac policlonal de conejo (2)	Ac monoclonal de ratón (3)
VEGF (0,5 ng)	0,012 μg	0,001 μ g	0,007 μ g	0,003 μ g

La tabla 3 establece una comparación entre el poder neutralizante del anticuerpo policlonal anti-VEGF murino producido anteriormente con el poder neutralizante de los anticuerpos anti-VEGF comercializados.

1. Anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra el VEGF, disponible en la compañía R&D con el nº de referencia AF-293-NA.

5 2. Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el VEGF, disponible en la compañía Peprotech con el nº de referencia 500-P10.

3. Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el VEGF, disponible en la compañía R&D con el nº de referencia MAB293.

Ejemplo 9.4: Producción de un anticuerpo monoclonal recombinante dirigido contra el IFN α humano

10 Material:

Las células mononucleares de la sangre humana periférica (PBMC) proceden de un sujeto inmunizado con IFN α humano desactivado químicamente.

El virus de Epstein Barr (EBV) ha sido preparado a partir de un sobrenadante de cultivo de la línea celular B95-8 y se ha utilizado a la concentración de 10⁵ TD₅₀/ml.

15 Cultivo:

Las PBMC han sido purificadas mediante gradiente de Ficoll y después infectadas por el virus. Las células transformadas por EBV son cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo a la concentración de 5 x 10³-10⁴/ml con medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) adicionado con 20% de SVF (Gibco BRL, Life Technologies). El medio se cambia cada 4 días. Después de 4 a 6 semanas de cultivo, las células son transferidas a unas placas de 24 pocillos y por último a unas placas de 6 pocillos. El sobrenadante de cultivo se analiza después mediante ELISA.

Selección de los clones productores de un anticuerpo monoclonal anti-IFN α

Los clones que producen unos anticuerpos anti-IFN α son seleccionados y cultivados en masa. Un anticuerpo monoclonal ha sido purificado a partir de un sobrenadante de cultivo mediante adsorción sobre una columna de sefarsa proteína A. El anticuerpo monoclonal producido ha sido purificado mediante adsorción sobre una columna de sefarsa proteína A. La disolución de anticuerpo monoclonal anti-IFN α purificado presenta un contenido en anticuerpo monoclonal de 1 mg/ml y su actividad neutralizante (poder de inhibición en 50% la actividad de 1 UI de IFN α) o ND50 igual a 0,7 μ g.

Estos clones producen unos anticuerpos que representan un material celular de alto rendimiento para la producción de un anticuerpo monoclonal humano anti-IFN α (hu) de alta afinidad utilizando la tecnología del "fago display" conocida por el experto en la materia y descrita en la presente solicitud.

Tabla 4

	Ac del ejemplo 9.4	Ac policlonal de conejo (1)	Ac policlonal ovino (2)	Ac monoclonal de ratón (3)
IFN α humano (1 UI)	0,07 μg	0,01 μ g	0,0005 μ g	0,8 μ g

La tabla 4 establece una comparación entre el poder neutralizante del anticuerpo monoclonal IFN α producido anteriormente con el poder neutralizante de los anticuerpos comercializados. El título obtenido con el anticuerpo producido anteriormente es aproximadamente 50 veces superior al título obtenido con un anticuerpo monoclonal de ratón.

1. Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el IFN α , disponible en la compañía PBL Biomedical Pharmaceutical con el nº de referencia 31100-1.

2. Anticuerpo policlonal ovino dirigido contra el IFN α , disponible en la compañía PBL Biomedical Pharmaceutical con el nº de referencia 31130-1.

3. Anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el IFN α , disponible en la compañía PBL Biomedical Pharmaceutical con el nº de referencia 21105-1.

EJEMPLO 10: Determinación del porcentaje de citoquina fijada sobre la proteína portadora (KLH) mediante ELISA doble sándwich

El porcentaje de citoquina fijada sobre la proteína portadora (KLH) ha sido determinado mediante un ensayo ELISA doble sándwich, con la ayuda de un anticuerpo de captura dirigido específicamente contra la proteína portadora.

- 5 Se fijan 100 μ l de anticuerpos policlonales de caballo dirigidos contra el KLH (1 mg/ml) diluidos en un tampón de fosfato 10 mM pH 7,3 NaCl 150 mM (PBS) en unos pocillos de una placa de microtitulación (high-binding; Costar) durante 2 horas a 37°C. Después de 3 lavados en PBS/de Tween 20 al 0,1% (PBST), los pocillos son saturados con PBS que contiene 2% de SVF. Después de 1h30 de saturación, los pocillos se lavan 3 veces con PBST, y después se añaden
- 10 unas diluciones de 2 en 2 de heterocomplejo (10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 y 0,156 μ g/ml), realizadas repetidamente, en los pocillos (100 μ l/pocillo). Después de 2 horas de incubación, los pocillos se lavan 3 veces con el PBST. El tween, agente disociante, presente en el tampón de lavado, permite eliminar cualquier molécula no fijada de manera covalente sobre el KLH que está fijado específicamente en el anticuerpo de captura. Después, las dos diluciones de heterocomplejo son tratadas de 2 maneras diferentes.
- a. la primera serie se incuba con un anticuerpo dirigido contra el KLH.
- 15 b. la segunda serie se incuba con un anticuerpo dirigido contra la citoquina.

Después de 1h30 de incubación a 37°C, los pocillos se lavan como anteriormente y después se incuban con un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa, dirigido contra la especie de origen del primer anticuerpo. Después de 1h30 de incubación a 37°C, los pocillos se lavan nuevamente. Después, la adición del sustrato de la peroxidasa, O-fenilendiamina (OPD), permite revelar la presencia del KLH fijado por el anticuerpo de captura y de las citoquinas fijadas de manera covalente sobre el KLH.

20

La cantidad de KLH fijado por el anticuerpo de captura y después la cantidad de moléculas de citoquina fijada sobre el KLH de manera covalente se calculan con la ayuda de curvas de calibrado realizadas mediante ELISA.

Se determina entonces el porcentaje de citoquina fijada de manera covalente al KLH.

Referencias bibliográficas

- 25 Eastcott JW, Holmberg CJ, Dewhirst FE, Esch TR, Smith DJ, Taubman MA. (2001) Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. *Vaccine*. 8 de febrero de 2001; 19(13-14):1636-42.
- Gallichan WS, Woolstencroft RN, Guarasci T, McCluskie MJ, Davis HL, Rosenthal KL. (2001) Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol*. 1 de marzo de 2001;166(5):3451-7.
- 30 Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao YF, Miyazono K, Urabe A, Takaku F. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* Aug;140(2):323-34.
- 35 McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL (2000) Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Mol Med*. Oct; 6 (10):867-77.
- 40 Rippmann JF, Klein M, Hoischen C, Brooks B, Rettig WJ, Gumpert J, Pfizenmaier K, Mattes R, Moosmayer D. (1998) Prokaryotic expression of single-chain variable-fragment (scFv) antibodies: secretion in L-form cells of *Proteus mirabilis* leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. Diciembre de 1998;64(12):4862-9.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición vacunal caracterizada porque comprende, a título de principio activo, un producto inmunógeno estable que comprende unos heterocomplejos inmunógenos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas desactivadas, respectivamente seleccionadas de entre el IFN α , la IL-4 y el TNF α , y (ii) unas moléculas proteicas portadoras en las que menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas desactivadas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) mediante un enlace covalente.
2. Composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además unos oligodesoxinucleótidos CpG a título de adjuvante.
- 10 3. Composición vacunal, caracterizada porque comprende, a título de principio activo, un producto inmunógeno estable que comprende unos heterocomplejos inmunógenos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas desactivadas, respectivamente seleccionadas de entre el IFN α , la IL-4 y el TNF α , y (ii) unas moléculas proteicas portadoras en las que menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas desactivadas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) mediante un enlace covalente para la utilización como medicamento.