

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 229**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06818201 .3**  
96 Fecha de presentación: **24.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1888122**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT alfa y una proteína transportadora**

30 Prioridad:  
**24.05.2005 EP 05300404**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**ZAGURY, Daniel y**  
**LE BUANEC, Hélène**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 382 229 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**

Procedimiento para la preparación de un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora para obtener una respuesta inmunitaria humoral en un mamífero con producción de anticuerpos que neutralizan la actividad biológica del FNT $\alpha$ , así como a un procedimiento para preparar su preparación.

Dicho producto inmunógeno estable puede denominarse también producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  o también un producto inmunógeno para producir anticuerpos anti-FNT $\alpha$ .

La presente invención se refiere además a varias composiciones que comprenden dicho producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora así como a los procedimientos de preparación de las mismas.

**Antecedentes de la invención**

Un procedimiento general para preparar un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos que comprenden una o más proteínas antigénicas de interés y por lo menos una proteína transportadora se ha descrito en la solicitud PCT publicada con el n° WO 2004/024189 en la denominación de NEOVACS. Particularmente, dicha solicitud PCT dio a conocer un procedimiento para preparar dichos heterocomplejos utilizando FNT $\alpha$  como antígeno de interés y KLH como proteína transportadora. Dicho procedimiento general de la técnica anterior, cuando se realizó para preparar heterocomplejos que comprenden FNT $\alpha$  y KLH, comprendía las etapas siguientes:

- a) obtener una mezcla de KLH con FNT $\alpha$ ;
- b) añadir a dicha mezcla glutaraldehído a una concentración final de 0,026 M;
- c) eliminar el exceso de glutaraldehído realizando una diálisis;
- d) añadir formaldehído a la solución dializada y mantener la presencia de formaldehído durante un periodo de 48 horas;
- e) añadir glicina a la solución obtenida al final de la etapa d); y
- f) realizar una diálisis con la solución obtenida al final de la etapa e).

Los ejemplos de la solicitud PCT n° WO 2004/024189 demostraron que el producto inmunógeno FNT $\alpha$ /KLH resultante era estable y podía aumentar la producción de anticuerpos que poseen una buena actividad neutralizante contra el FNT $\alpha$  natural.

Sin embargo, posteriormente, parecía que resultaban necesarios heterocomplejos más eficaces para satisfacer el nivel de requisitos elevados de varias autoridades sanitarias, incluyendo los Estados Unidos y Europa, para preparar composiciones de vacunas adecuadas que contienen dichos heterocomplejos como principal principio activo.

**Descripción detallada de la invención**

Se ha descubierto que cuando el procedimiento general dado a conocer en la solicitud PCT n° WO 2004/024189, se aplica a heterocomplejos que comprenden FNT $\alpha$  y una proteína transportadora, conducen a productos inmunógenos finales en los que tanto la inactivación como la inmunogenicidad del FNT $\alpha$  tendrían que mejorarse, habida cuenta la preparación de las composiciones de la vacuna anti-FNT $\alpha$  que deben ser aprobadas por varias autoridades sanitarias en todo el mundo. El solicitante ha descubierto también que la estabilidad del producto inmunógeno completo debería mejorarse, fundamentalmente para aumentar su estabilidad en el tiempo de almacenamiento.

Se ha descubierto recientemente un nuevo procedimiento para preparar un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora que permite alcanzar varios objetivos descritos anteriormente.

Un objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para preparar un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora, que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una solución líquida que contiene FNT $\alpha$ ;
- b) añadir EDTA a dicha solución líquida que contiene FNT $\alpha$  de la etapa a);

c) añadir una proteína transportadora a la solución líquida obtenida al final de la etapa b), para obtener una mezcla líquida de FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora;

5 d) añadir glutaraldehído a una mezcla líquida obtenida al final de la etapa c), con el fin de conjugar en parte por enlace covalente las moléculas del FNT $\alpha$  con dicha proteína transportadora y obtener heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora;

10 e) eliminar el glutaraldehído y las moléculas libres tanto de FNT $\alpha$  como de dicha proteína transportadora de la solución obtenida al final de la etapa d), con el fin de obtener una solución líquida que contiene heterocomplejos purificados entre el FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora;

15 f) añadir formaldehído a la solución líquida obtenida al final de la etapa e), y mantener la presencia de formaldehído durante un periodo que oscila entre 96 horas y 192 horas;

g) añadir un reactivo que bloquea la reacción con formaldehído a la solución líquida que contiene heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora, obtenida al final de la etapa f); y

20 h) eliminar el formaldehído y el agente de bloqueo procedente de la solución líquida obtenida al final de la etapa g), con el fin de obtener una solución líquida que contiene dicho producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora.

25 Al realizar el procedimiento descrito anteriormente, los productos inmunógenos estables resultantes están provistos de una capacidad aumentada para inducir la producción de anticuerpos que neutralizan el FNT $\alpha$  natural, cuando se administran a un mamífero junto con uno o más complejos inmunoadyuvantes.

30 Un "producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora", tal como se utiliza en la presente memoria, consiste en un producto inmunógeno que produce anticuerpos que neutralizan la actividad biológica de FNT $\alpha$ , cuyo producto inmunógeno comprende asociaciones de proteínas entre (i) moléculas de FNT $\alpha$  y (ii) moléculas transportadoras, en las que menos del 40% de las moléculas FNT $\alpha$  están unidas a las moléculas transportadoras por enlaces químicos covalentes.

35 El producto inmunógeno estable preparado por el procedimiento anterior es "inmunógeno" porque produce anticuerpos contra FNT $\alpha$  natural en un paciente, después de su administración a dicho paciente, y más específicamente anticuerpos que neutralizan la actividad biológica del FNT $\alpha$  natural.

40 El producto inmunógeno preparado por el procedimiento anterior es "estable" ya que dicho producto inmunógeno posee su propio punto isoeléctrico que puede distinguirse del punto isoeléctrico de por lo menos (i) FNT $\alpha$  (ii) la molécula transportadora, y ya que dicho producto inmunógeno migra, en un ensayo de isoelectroenfoque, como una banda de proteína que se distingue de por lo menos una de las dos bandas de proteínas correspondientes a (i) FNT $\alpha$  y (ii) la molécula transportadora, respectivamente. Esto significa que un producto inmunógeno según la invención no comprende moléculas de FNT $\alpha$  libres no unidas ni moléculas de proteína transportadora libres no unidas.

45 El producto inmunógeno preparado por el procedimiento anterior comprende "heterocomplejos antigénicos" o "heterocomplejos" de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora porque dicho producto inmunógeno comprende (i) el FNT $\alpha$  antigénico y (ii) las moléculas de proteína transportadora antigénica que están unidas (a) parcialmente por enlaces covalentes (menos de 40% de enlaces covalentes) y (b) parcialmente por enlaces no covalentes débiles (más del 60% de enlaces no covalentes) que contienen interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van del Waals, etc.

55 El producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora que se definió anteriormente, que puede prepararse según el procedimiento de la invención, puede también calificarse de forma más sencilla en la presente memoria como un producto inmunógeno para producir, o que produce, anticuerpos anti-FNT $\alpha$  en un ser humano o en un animal, o también como un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$ .

60 Gracias a las etapas combinadas del procedimiento según la invención, el producto inmunógeno estable final se obtiene con una reproducibilidad mayor que los heterocomplejos que comprenden FNT $\alpha$  y una proteína transportadora obtenida según el procedimiento de la técnica anteriormente dado a conocer en la solicitud PCT n° WO 2004/024189 mencionada anteriormente.

65 Particularmente, se ha descubierto que la actividad inmunógena del producto inmunógeno estable preparado mediante la realización del procedimiento según la invención era muy reproducible, de un lote de preparación al otro.

Tal como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, los productos inmunógenos estables preparados al realizar el procedimiento según la invención están desprovistos de actividad biológica de FNT $\alpha$  detectable, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que la dosis DE<sub>50</sub> es superior a 50 ng/ml, y todavía superior a 400 ng/ml, expresados como concentración final de FNT $\alpha$ .

Además, se demuestra en la presente memoria también que más allá de la inducción de altos valores de anticuerpo anti-FNT $\alpha$ , los productos inmunógenos estables preparados al realizar el procedimiento según la invención inducen la producción de anticuerpos anti-FNT $\alpha$  neutralizantes que tienen una capacidad neutralizante CN<sub>50</sub> superior a 1/1.000.

Además, se ha derepresentado también que los productos inmunógenos estables preparados al realizar el procedimiento según la invención pueden administrarse de manera satisfactoria a mamíferos, ya que estos productos no producen ningún efecto secundario adverso, particularmente ninguna inflamación ni alteración de los órganos tales como el corazón, los pulmones, el hígado y el bazo aun cuando se administren en una cantidad de 4.000 veces la dosis terapéutica unitaria humana (SHTD).

Además, los productos inmunógenos estables preparados al realizar el procedimiento según la invención inducen una pujante producción de anticuerpos neutralizantes anti-FNT $\alpha$ , especialmente del isótopo de IgG, en macacos Rhesus, lo que demuestra que estos productos inmunógenos estables pueden romper la tolerancia inmunológica para las proteínas producidas de forma endógena y inducir una vacunación eficaz lo que conduce a la neutralización de FNT $\alpha$ , vacunación que puede prevenir efectos perjudiciales de la sobreproducción de FNT $\alpha$  en todas las situaciones patológicas en las que está implicado FNT $\alpha$ .

Se ha derepresentado además que los productos inmunógenos estables preparados al realizar el procedimiento según la invención pueden vacunar eficazmente mamíferos contra la artritis producida por FNT $\alpha$ . Aún más, se ha derepresentado que estos productos inmunógenos estables pueden evitar y/o tratar la sinovitis inflamatoria por artritis producida por FNT $\alpha$  y la destrucción articular cuando se utilizan solos, sin necesidad de complementar el tratamiento preventivo o curativo con ningún principio activo adicional contra la artritis, como el metotrexato.

Se ha derepresentado también que los productos inmunógenos estables preparados según el procedimiento de la invención podían evitar y/o tratar el choque letal originado por la sobreproducción de FNT $\alpha$ .

Por lo tanto, los productos inmunógenos estables preparados según la presente invención producen protección autoinmunitaria anti-FNT $\alpha$  contra las patologías agudas y crónicas dependientes de FNT $\alpha$ , sin efectos secundarios detectables.

La combinación específica de las etapas a) a h) permite conservar la información espacial del producto de partida de FNT $\alpha$  mientras que se aumenta la exposición de los epitopos antigénicos principales de FNT $\alpha$  al disolvente, con el fin de maximizar una presentación eficaz del antígeno FNT $\alpha$  a las células inmunocompetentes, cuando el producto inmunógeno estable se administra a un mamífero.

La combinación específica de las etapas a) a h) permite tanto una estabilización estructural como química mejor del producto inmunógeno final, cuando se utilizan FNT $\alpha$  y KLH, que el procedimiento dado a conocer en la solicitud PCT n° WO 2004/024189. Dichas propiedades específicas de los productos inmunógenos estables resultantes obtenidas por el procedimiento deberían permitir la preparación de composiciones de la vacuna que son también muy estables durante un período prolongado de almacenaje.

Además, se ha descubierto que el procedimiento de la invención permite la preparación de un producto inmunógeno estable final que no está provisto de ninguna actividad biológica residual del producto de partida FNT $\alpha$ . Especialmente, se ha descubierto que la DE<sub>50</sub> del producto de partida FNT $\alpha$  era de aproximadamente 10 pg/ml de la invención. El producto inmunógeno estable final obtenido por el procedimiento de la invención tiene un valor de DE<sub>50</sub> superior a 50 ng/ml, e incluso en la mayoría de los casos superior a 400 ng/ml. Al mismo tiempo, el producto inmunógeno estable final está provisto de una alta inmunogenicidad.

Aún más, se ha descubierto que el producto inmunógeno obtenido por el procedimiento según la invención ha conservado la configuración principal del FNT $\alpha$  natural, ya que dicho producto inmunógeno todavía se une a los receptores R1 y R2 de FNT $\alpha$ , a pesar de su inactivación biológica.

En la etapa a), FNT $\alpha$  consiste en un FNT $\alpha$  natural seleccionado del grupo constituido por FNT $\alpha$  de ratón, FNT $\alpha$  de rata, FNT $\alpha$  de conejo y FNT $\alpha$  humano. Preferentemente, FNT $\alpha$  consiste en FNT $\alpha$  humano.

En determinadas formas de realización del procedimiento según la invención, la etapa b) comprende las etapas siguientes:

b1) añadir EDTA a dicha solución líquida que contiene FNT $\alpha$  de la etapa a); y

b2) añadir DMSO a la solución líquida obtenida al final de la etapa b1).

Se ha descubierto según la invención que la adición de DMSO en la etapa b2) aumentaba la inmunogenicidad del producto inmunógeno estable final.

5

En determinadas formas de realización del procedimiento, la etapa d) comprende las etapas siguientes:

d1) añadir glutaraldehído a la mezcla líquida obtenida al final de la etapa c), con el fin de conjugar parcialmente por enlace covalente las moléculas FNT $\alpha$  a dicha proteína transportadora y obtener heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora; y

10

d2) añadir EDTA a los heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora obtenida al final de la etapa d1).

De este modo, al final de la etapa d1), se obtiene una solución líquida, que contiene un producto que comprende moléculas de FNT $\alpha$  que están unidas a las moléculas transportadoras (i) parcialmente por enlaces covalentes y (ii) parcialmente por enlaces no covalentes.

15

El procedimiento según la invención comprende la etapa h) para eliminar el formaldehído y el agente de bloqueo en la solución obtenida y al final de la etapa g) con el fin de obtener un producto inmunógeno estable purificado que comprende heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora.

20

Al final de la etapa h) el producto inmunógeno estable se obtiene en forma de una solución líquida incolora traslúcida que está prácticamente exenta de partículas visibles.

En determinadas formas de realización, dicho procedimiento puede comprender también una etapa adicional i) de congelación de la solución obtenida al final de la etapa h).

25

En otras determinadas formas de realización, dicho procedimiento puede comprender además, una etapa adicional i) de liofilización de la solución obtenida al final de la etapa h), con el fin de obtener un polvo blanco que puede almacenarse durante un período prolongado antes de su utilización.

30

En las formas de realización preferidas de la etapa a), la concentración en FNT $\alpha$  está comprendida entre 0,1 mg/ml y 50 mg/ml, y aún más preferentemente está comprendida entre 0,5 mg/ml y 10 mg/ml.

En las formas de realización preferidas de la etapa b), la concentración final de EDTA está comprendida entre 1 mM y 500 mM, y aún más preferentemente está comprendida entre 1 mM y 10 mM.

35

Todavía más preferentemente, EDTA se añade a una solución tampón que presenta un pH comprendido entre 7 y 8,5, más preferentemente entre 7,5 y 8,1.

40

En las formas de realización preferidas de la etapa b2), los intervalos de concentración en DMSO final están comprendidos entre 0,5% v/v y 20% v/v, aún más preferentemente entre 5% v/v y 20% v/v.

Todavía más preferentemente, la etapa b2) se lleva a cabo durante un período comprendido entre 10 min. y 50 min., más preferentemente entre 20 min. y 40 min.

45

En las formas de realización preferidas de la etapa c), la relación molar de FNT $\alpha$  a dicha proteína transportadora está comprendida entre 5:1 y 100:1, y aún más preferentemente está comprendida entre 20:1 y 80:1. En la mayoría de las formas de realización preferidas de la etapa c), la relación molar de FNT $\alpha$  a dicha proteína transportadora está comprendida entre 30:1 y 70:1 o entre 40:1 y 60:1.

50

En las formas de realización preferidas de la etapa d), la concentración en glutaraldehído final está comprendida entre 0,05% p/p y 0,5% p/p. Una concentración final de glutaraldehído está comprendida entre 0,02 M y 0,03 M es adecuada, consistiendo la mayor parte de la concentración final de glutaraldehído preferida en 0,026 M.

55

Todavía más preferentemente, la etapa d2) se realiza durante un periodo comprendido entre 30 min. y 60 min., más preferentemente entre 40 min. y 50 min.

En las formas de realización preferidas de la etapa d2), la concentración de EDTA final está comprendida entre 1 mM y 10 mM.

60

En las formas de realización preferidas de la etapa e), el glutaraldehído se elimina realizando una diálisis, realizando una ultrafiltración con filtración por diálisis o realizando una filtración en flujo tangencial (FFT).

Cuando se realiza la diálisis, se utiliza preferentemente una membrana para diálisis con un umbral de corte entre 6 y

65

8 kDa.

La etapa de diálisis comprende preferentemente tres etapas, incluyendo (i) las dos primeras etapas realizadas con el tampón de trabajo (fosfato 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,8, EDTA 5 mM) y (ii) la última etapa realizada con PBS.

Normalmente la etapa de diálisis se realiza con una solución tampón convencional, tal como la solución salina tamponada con fosfato (PBS) frente a 200 a 400 veces el volumen de la solución líquida que contiene los heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y la proteína transportadora, en la que las moléculas de FNT $\alpha$  están parcialmente conjugadas con enlace covalente a la proteína transportadora que se utiliza.

Cuando se realiza la ultrafiltración con filtración por diálisis, se utiliza preferentemente una membrana de filtración con un umbral de corte de 10.000 kDa, apreciándose que los heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y la proteína transportadora se encuentran en la materia retenida en la ultrafiltración. Normalmente, el líquido utilizado para la filtración con diálisis consiste en una solución tampón tal como una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Normalmente, la filtración con diálisis se realiza 3 veces con un volumen igual de tampón.

En las formas de realización preferidas de la etapa f), la concentración final de formaldehído oscila entre 1% p/p y 10% p/p, y aún más preferentemente entre 2% p/p y 5% p/p.

En la etapa f) la presencia de formaldehído se mantiene durante un periodo comprendido entre 96 horas y 192 horas.

Se ha apreciado según la invención que manteniendo la presencia de formaldehído con los heterocomplejos durante un periodo inferior a 96 horas conducía a un compuesto inmunógeno final que era significativamente menos estable en el tiempo, en comparación con un compuesto inmunógeno estable obtenido según las formas de realización preferidas del procedimiento según la presente invención.

Por otra parte, se ha descubierto según la invención que manteniendo la presencia de formaldehído en los heterocomplejos durante un periodo de más de 192 horas conducía a un compuesto inmunógeno final que era muy estable pero con una capacidad significativamente reducida para producir anticuerpos con una gran actividad neutralizante contra el FNT $\alpha$  natural.

Más preferentemente, en la etapa f), la presencia de formaldehído se mantiene durante un periodo que oscila entre 120 horas y 168 horas.

Más preferentemente, en la etapa f), la presencia de formaldehído se mantiene durante un periodo que oscila entre 130 horas y 150 horas.

Ventajosamente, la etapa f) se realiza a una temperatura comprendida entre 30°C y 42°C, más preferentemente 35°C y 39°C.

En la etapa g), el reactivo que bloquea la reacción de las moléculas de proteína con formaldehído puede consistir en cualquier compuesto adecuado que comprenda por lo menos un grupo amino y que interrumpa la reacción química de las moléculas de proteína con el formaldehído.

En determinadas formas de realización preferidas, dicho reactivo de bloqueo consiste en glicina.

En las formas de realización preferidas de la etapa g), la concentración final de glicina está comprendida entre 0,01% M y 10 M, y aún más preferentemente oscila entre 0,05 M y 2 M.

En otras determinadas formas de realización preferidas de la etapa g), dicho reactivo de bloqueo consiste en lisina.

En formas de realización preferidas de la etapa g), la concentración final de lisina está comprendida entre 0,01% M y 10 M, preferentemente entre 0,05 M y 2 M, y aún más preferentemente entre 0,05 y 0,5 M.

En las formas de realización preferidas, las moléculas de proteína se ponen en contacto con lisina durante un periodo de incubación entre 1 hora y 10 días, y aún más preferentemente entre 5 y 10 días.

El periodo de incubación con lisina superior a 3 días, y aún más preferentemente de por lo menos 5 días conduce a una irreversibilidad óptima de la estructura química del producto final y contribuye a su buena inmunogenicidad y estabilidad.

Todavía más preferentemente, cuando se realiza la etapa h) el pH de la solución líquida se ajusta a un pH comprendido entre 6,8 y 7,8, más preferentemente entre 7,0 y 7,6, por ejemplo utilizando una base tal como NaOH.

En las formas de realización preferidas de la etapa h), el formaldehído y el agente de bloqueo se eliminan realizando una diálisis, realizando una ultrafiltración con filtración por diálisis, o realizando filtración en flujo tangencial (FFT).

5 Las condiciones para la diálisis, la ultrafiltración con filtración por diálisis, o la filtración en flujo tangencial (FFT) que se utilizan en la etapa h) son normalmente las mismas que las definidas anteriormente para la etapa e) anterior, o como se da a conocer en los ejemplos en la presente memoria.

10 Las expresiones "proteína transportadora" o "molécula de proteína transportadora", las utiliza en la presente memoria un experto en la materia según su significado convencional, es decir, una proteína que, cuando se acopla a una molécula antigénica, incluyendo una molécula de hapteno, permite la provocación de una respuesta inmunitaria en un organismo hospedador frente a dicha molécula antigénica, específicamente en mamíferos incluyendo los seres humanos. Tal como se utiliza en la presente memoria, dicha respuesta inmunitaria comprende la producción de anticuerpos dirigidos contra dicha molécula antigénica.

15 Según el procedimiento de la invención, una amplia variedad de proteínas transportadoras conocidas por cualquier experto en la materia puede utilizarse en la etapa c). La proteína transportadora debería llevar suficientes epítopos de linfocitos T colaboradores con el fin de activar los linfocitos T colaboradores y los linfocitos B y provocar que estas células liberen suficiente IL-1 e IL-2 para provocar la expansión de los clones de los linfocitos B que producirá anticuerpos anti-FNT $\alpha$  neutralizantes.

20 Una "molécula de proteína transportadora", incluida en el producto inmunógeno estable de la invención, hace referencia a cualquier proteína o péptido que tiene por lo menos 15 aminoácidos de longitud, independientemente de su secuencia de aminoácidos, y que, cuando está asociada por enlace covalente parcialmente a las moléculas de FNT $\alpha$  para formar heterocomplejos con la proteína componiendo el producto inmunógeno de la invención, permite que se presenten un gran número de moléculas de FNT $\alpha$  a los linfocitos B.

25 Según un primer aspecto, la molécula de proteína transportadora consiste en una proteína o un péptido que tiene por lo menos 15 aminoácidos de longitud, o también un oligómero de dicho péptido, que comprende uno o más epítopos T auxiliares ("colaboradores") capaces de activar los linfocitos T auxiliares ("colaboradores T") del organismo hospedador para producir citocinas, incluyendo interleucina 2, activando y provocando dichas citocinas, a su vez, la proliferación de linfocitos B, que, tras la maduración, producirán anticuerpos producidos contra FNT $\alpha$ .

30 La molécula de proteína transportadora podría también consistir en un homooligómero o un homopolímero de la proteína natural, de la que procede, así como en un homooligómero o un homopolímero de un fragmento de péptido de la proteína natural, de la que procede. La proteína antigénica de interés podría consistir también en un heterooligómero o un heteropolímero que comprende una combinación de varios fragmentos peptídicos distintos incluidos inicialmente en la proteína natural de la que proceden.

35 Los ejemplos de proteínas transportadoras que pueden utilizarse cuando se realiza el método según la invención incluyen las vacunas antidiftéricas y antitetánicas (DT, DT CRM197, otros mutantes de DT, por ejemplo, posición Glu-148, etc. Véase, por ejemplo la patente US nº 4.709.017, WO 93/25210, WO 95/33481, etc.) y TT (y fragmento C de TT) respectivamente), hemocianina de la lapa californiana (KLH) OMPC de *N. meningitides* y la proteína purificada procedente de tuberculina (PPD).

40 La función del transportador consiste en proporcionar ayuda de citocina con objeto de aumentar la respuesta inmunitaria contra FNT $\alpha$ . Una lista no exhaustiva de transportadores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen: hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúminas de suero tales como la albúmina de suero bovino (ASB), toxinas de bacterias inactivadas tales como las toxinas del tétanos o de la difteria (TT y DT) o fragmentos recombinantes de las mismas (por ejemplo, dominio 1 del fragmento C de TT, o el dominio de transposición de DT), o el derivado de la proteína purificada de la tuberculina (PPD).

45 En una forma de realización del procedimiento, el transportador es la proteína D procedente de *Haemophilus influenzae* (patente EP 0 594 610 B1). La proteína D es una proteína de unión a IgD procedente de *Haemophilus influenzae* y ha sido patentada por Forsgren (WO 91/18926, concedida a EP 0 594 610 B1). En algunas circunstancias, por ejemplo en los sistemas recombinantes de expresión del inmunógeno puede desearse utilizar fragmentos de proteína D, por ejemplo proteína D 1/3.sup.rd (que comprenden los aminoácidos N-terminales 100 a 110 de la proteína D (documentos WO 99/10375; WO 00/50077)).

50 Por lo tanto, en las formas de realización preferidas del procedimiento, dicha proteína transportadora se selecciona de entre el grupo constituido por la vacuna antidiftérica (DT) y mutantes de la misma, la vacuna antitetánica (TT), hemocianina de la lapa californiana (KLH) y la proteína purificada derivada de la tuberculina (PPD), OMPC de *N. meningitides*, la proteína purificada derivada de la tuberculina (PPD), la albúmina del suero bovino (ASB) y la proteína D de *Haemophilus influenzae*.

55 Aún más preferentemente, la proteína transportadora consiste en la hemocianina de la lapa californiana (KLH).

La presente invención se refiere también a un procedimiento para preparar una composición de vacuna que comprende las etapas siguientes:

- 5 a) preparar un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  realizando el procedimiento definido anteriormente; y
- b) combinar dicho producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  preparados en la etapa a) con uno o más inmunoadyuvantes.

10 Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, el producto inmunógeno estable, que puede también denominarse en la presente memoria producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$ , que consiste en el producto final obtenido por el procedimiento según la invención, posee propiedades fisicoquímicas y biológicas específicas.

15 Generalmente, el producto inmunógeno anti- FNT $\alpha$  según la presente invención posee un peso molecular comprendido entre 50 kDa y 8.000 kDa (8 MDa), presentando aproximadamente el 30% de la cantidad total de proteína un peso molecular inferior a 1.000 kDa (1 MDa).

20 Además el producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la presente invención presenta una relación molar de FNT $\alpha$  a dicha proteína transportadora comprendida entre 40:1 y 60:1.

25 Además, un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención, cuando se incubaba en condiciones desnaturalizantes en las que se eliminan los enlaces no covalentes, como en un tampón que contiene SDS, generan más de un producto proteico, que ilustra que las moléculas FNT $\alpha$  y las moléculas de proteína transportadora comprendidas en las mismas están unidas, por lo menos parcialmente, por enlaces no covalentes, por ejemplo enlaces débiles que comprenden interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno y enlaces de Van der Waals.

30 Además, se ha descubierto que, en un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención, los enlaces covalentes entre las moléculas de FNT $\alpha$  y las moléculas de proteína transportadora representan siempre menos del 40% de los enlaces totales entre estas moléculas, ya que siempre más del 60% del contenido en moléculas de FNT $\alpha$  y dicho producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  se liberan como moléculas no unidas a la proteína transportadora en condiciones desnaturalizantes.

35 Como se muestra en los ejemplos en la presente memoria, incluyendo el Ejemplo 8, un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención comprende por lo menos las siguientes especies de proteína:

- moléculas FNT $\alpha$  unidas por enlace covalente a las moléculas de proteína transportadoras; y
- moléculas que están unidas por enlaces no covalentes, que incluyen:
  - 40 - monómeros de moléculas FNT $\alpha$ ;
  - dímeros de moléculas de FNT $\alpha$ ;
  - trímeros de moléculas de FNT $\alpha$ ;
  - polímeros de dímeros y/o trímeros de moléculas de FNT $\alpha$ ;
  - monómeros de moléculas de proteína transportadora; y
  - 45 - polímeros de moléculas de proteína transportadora.

Significativamente, el producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención induce la producción de anticuerpos anti-FNT $\alpha$  que tienen una capacidad de neutralización (CN<sub>50</sub>) de FNT $\alpha$  superior a 1/1.000.

50 La capacidad de neutralización de FNT $\alpha$  consiste en la dilución del suero que neutraliza el 50% de la actividad citotóxica de FNT $\alpha$ . Esta característica biológica de un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención es fácil, directa y fidedignamente evaluada por cualquier experto en la materia utilizando las técnicas convencionales que se describen en los ejemplos y están también más detalladas en al presente memoria.

55 El valor de CN<sub>50</sub> del producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  de la invención es claramente distinto del valor de CN<sub>50</sub> obtenido para el producto inmunógeno estable preparado según el procedimiento descrito en la solicitud PCT anterior n° WO 2004/024189.

60 La comparación entre los valores de CN<sub>50</sub> de un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  específico en el que la proteína transportadora consta de KLH se detalla en los ejemplos en la presente memoria, principalmente en la Tabla 3.

65 El producto inmunógeno FNT $\alpha$ -KLH según la invención consiste en el lote denominado "K7", mientras que el producto inmunógeno estable correspondiente preparado según el procedimiento dado a conocer en la solicitud PCT anterior n° WO 2004/024189 consta del lote denominado "K10", tal como se encuentra en la Tabla 3.



Como se muestra en la Tabla 3, el valor de  $CN_{50}$  obtenido para el producto inmunógeno estable preparado según el procedimiento dado a conocer en la solicitud PCT anterior n° WO 2004/024189 es de 1/700. El valor de  $CN_{50}$  obtenido para el producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención es 1/1.200, por lo tanto aproximadamente la mitad del valor  $CN_{50}$  obtenido para el producto de la técnica anterior.

Esta capacidad de neutralización mejor de FNT $\alpha$  del producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención es proporcionada al producto final por la combinación específica de las propiedades del procedimiento según la invención, incluyendo la utilización de EDTA en la etapa b), y manteniendo la presencia de formaldehído durante un periodo que oscila entre 96 horas y 192 horas en la etapa de f).

Específicamente, como se muestra en la Tabla 3 en la presente memoria, que mantiene la presencia de formaldehído durante un periodo que oscila entre 96 horas y 192 horas en la etapa de f) es determinante para obtener un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  final dotado de los mejores valores bajos de  $CN_{50}$ .

Además, como se muestra en la Tabla 3 en la presente memoria, manteniendo la presencia de formaldehído durante un período comprendido entre 96 y 192 horas en la etapa de f) permite también obtener un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  final en el que la actividad citotóxica de FNT $\alpha$  ha sido completamente bloqueada, con valores de  $DE_{50}$  (dosis eficaz $_{50}$ ) superiores a 50 ng/ml, preferentemente superiores a 400 ng/ml, y algunas veces por lo menos de 10 pg/ml.

La evaluación del valor de la capacidad de neutralización  $CN_{50}$  de FNT $\alpha$  de un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención se da a conocer con detalle en el Ejemplo 3 y se detalla brevemente a continuación.

Un procedimiento típico directa y fidedignamente utilizable por un experto en la materia para medir el valor de la capacidad de neutralización ( $CN_{50}$ ) de FNT $\alpha$  de un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  comprende las etapas siguientes:

- a) administrar ratones con una combinación del producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  que va a probarse y el adyuvante completo de Freund (ACF), por vía intramuscular;
- b) el día 21 después de la etapa a), administrar a los mismos ratones una combinación del producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  que va a probarse y adyuvante incompleto de Freund (AIF), por vía intramuscular;
- c) el día 28 después de la etapa a), extraer muestras de sangre de cada ratón tratado en las etapas a) y b) anteriormente;
- d) determinar qué dilución de los sueros que se originan de las muestras de sangre extraídas en la etapa c) inhibe el 50% de actividad citotóxica de una cantidad convencional de FNT $\alpha$ ;

Para realizar el procedimiento de evaluación del valor de  $CN_{50}$  anterior, se mide la actividad citotóxica de FNT $\alpha$  según la prueba citotóxica convencional utilizando la estirpe celular L929. Preferentemente, la cantidad normal de FNT $\alpha$  es de 20 ng/ml de concentración final en los cultivos de células L929.

Tal como se describe en los ejemplos en la presente memoria, y específicamente en la Tabla 3 en la presente memoria, el valor de  $DE_{50}$  consiste en la concentración final de un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención que produce 50% de citotoxicidad en la prueba de citotoxicidad convencional de células L929.

Se ha descubierto que otra característica que distingue un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención forma el producto inmunógeno estable descrito en la solicitud PCT n° WO 2004/024189 consiste en el  $DE_{50}$ , que es superior a 50 ng/ml, y aún más de 400 ng/ml, y a veces hasta 10 pg/ml, mientras que un  $DE_{50}$  de aproximadamente 15 ng/ml se obtuvo para el producto de la técnica anterior.

Sin querer estar ligado por ninguna teoría específica, el solicitante cree que las mejores propiedades biológicas, incluyendo la falta de actividad de FNT así como la alta inmunogenicidad, del producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  obtenido por el procedimiento según la invención ilustran que el producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  según la invención es estructuralmente distinto de los productos inmunógenos estables dados a conocer en la solicitud PCT n° WO 2004/024189, aunque pueden no ser fácilmente detectables los cambios estructurales específicos.

La presente invención también se refiere a un producto inmunógeno estable preparado por el procedimiento de la invención.

En determinadas formas de realización, la proteína transportadora consiste en KLH.

El porcentaje de moléculas de proteína transportadora y de proteínas de FNT $\alpha$  de interés unidas entre sí por enlaces covalentes por un producto inmunógeno de la invención puede ser comprobado fácilmente por un experto en la

materia.

Por ejemplo, determinando el porcentaje de moléculas de FNT $\alpha$  unidas a moléculas de proteína transportadora por un enlace covalente en un producto inmunógeno de la invención podría hacerse utilizando las siguientes etapas:

- (i) someter dicho producto inmunógeno en solución a condiciones desnaturalizantes y reductoras;
- (ii) realizar una etapa de cromatografía por exclusión de tamaño con el producto obtenido al final de la etapa (i) durante la cual varios componentes de la proteína con masa molecular decreciente eluyen sucesivamente del soporte de la cromatografía por exclusión de tamaño;
- (iii) medir la cantidad de moléculas de FNT $\alpha$  unidas por enlace covalente a la molécula transportadora en la fracción eluída que contiene los componentes proteicos con la mayor masa molecular;
- (iv) comparar la cantidad de FNT $\alpha$  medido en la etapa (iii) con la cantidad total de FNT $\alpha$  incluida inicialmente en el producto inmunógeno de partida.

En la etapa (i) del procedimiento para determinar el porcentaje de enlace covalente descrito anteriormente, incubando una cantidad dada (en número de moles o en peso) del producto inmunógeno de la invención en condiciones desnaturalizantes y reductoras conduce a una disociación de los enlaces débiles entre varios componentes proteicos no unidos entre sí por un enlace covalente.

Entre las condiciones desnaturalizantes preferidas existe la presencia de urea, por ejemplo, en la concentración 8 M final o la presencia de SDS, por ejemplo, en la concentración 1% final en el peso total de la solución que contiene el producto inmunógeno. Entre las condiciones reductoras preferidas existe la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, por ejemplo en la concentración 5% final del volumen total de la solución que contiene el producto inmunógeno.

En la etapa (ii) del procedimiento para determinar el porcentaje de moléculas de FNT $\alpha$  y de moléculas de proteína transportadora unidas entre sí por enlaces covalentes, el soporte de la cromatografía de exclusión por tamaño es seleccionado por un experto en la materia según este conocimiento general de la técnica. Por ejemplo, el experto en la materia puede hacer uso de soportes cromatográficos como los comercializados por Pharmacia Corporation bajo las marcas comerciales "Superdex 75<sup>TM</sup>", "Superdex 200<sup>TM</sup>" y "Superdex 400<sup>TM</sup>".

En la etapa (ii), la fracción molecular que corresponde a la molécula transportadora unida por enlace covalente a las moléculas FNT $\alpha$  eluye en primer lugar, antes de la(s) fracción o fracciones eluida(s) que contiene el antígeno de interés en forma libre. La cantidad de FNT $\alpha$  que eluye en forma libre corresponde a la fracción del antígeno de interés que no se unió por enlace covalente a la molécula transportadora, en el producto inmunógeno de partida. Es en la fracción de proteína de alto peso molecular que tiene lugar la medición de la cantidad de FNT $\alpha$  unido por enlace covalente a la molécula de proteína transportadora, por ejemplo, en una prueba inmunoenzimática, en una prueba radioinmunológica o en una prueba de inmunofluorescencia, ya sea directa o indirecta ("sándwich") utilizando anticuerpos específicos para FNT $\alpha$  y que no producen ninguna reacción inmunológica cruzada con la molécula de proteína transportadora.

En la etapa (iii) la cantidad de FNT $\alpha$  unida por enlace covalente a la molécula de proteína transportadora, que se mide como se describió anteriormente en la presente memoria, se compara con la cantidad inicial de FNT $\alpha$  que está incluida en la cantidad utilizada (en número de moles o en peso) del producto inmunógeno de partida y el porcentaje de de FNT $\alpha$  se calcula de este modo, que está unido por enlace covalente a la molécula de proteína transportadora, en el producto inmunógeno de la invención.

El porcentaje de moléculas de proteína transportadora y de FNT $\alpha$  unida entre sí por enlaces covalentes, en un producto inmunógeno de la invención, puede comprobarse fácilmente por un experto en la materia, utilizando un segundo procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a) inmovilizar un soporte de anticuerpos específicamente producidos contra la proteína transportadora;
- b) poner en contacto los anticuerpos producidos contra la proteína transportadora, que fueron inmovilizados en el soporte en la etapa a), con una cantidad conocida de moléculas del producto inmunógeno que va a probarse que comprende dicha proteína transportadora y FNT $\alpha$ ;
- c) eliminar las moléculas del producto inmunógeno que no están unidos a los anticuerpos antiproteína transportadora inmovilizada en la etapa a), mediante una solución acuosa tamponante que comprende uno o más agentes desnaturalizantes de proteínas;
- d) poner en contacto (i) complejos inmunógenos formados en la etapa c) entre los antiproteína transportadora inmovilizada en las moléculas del producto inmunógeno con (ii) anticuerpos específicamente producidos contra la

proteína transportadora;

d2) independientemente de la etapa d1), poner en contacto los complejos inmunógenos formados en la etapa c) entre los anticuerpos inmovilizados antiproteína transportadora y las moléculas del producto inmunógeno con (ii) anticuerpos específicamente producidos contra FNT $\alpha$ ;

e) e1) cuantificar los anticuerpos añadidos en la etapa d1) que se han unido a la proteína transportadora;

e2) cuantificar los anticuerpos añadidos en la etapa d2) que se han unido a FNT $\alpha$ ;

f) calcular la relación entre:

(i) la cantidad de anticuerpos unidos antiproteína transportadora medida en la etapa e1); y

(ii) la cantidad de anticuerpos unidos a anti-FNT $\alpha$  medida en la etapa e2),

consistiendo dicha relación en la proporción de moléculas de proteína transportadora y de moléculas de FNT $\alpha$  unidas entre sí por enlaces covalentes, con el producto inmunógeno de partida.

En la etapa c) del procedimiento descrito anteriormente, la utilización de la solución acuosa de lavado que contiene uno o más agentes desnaturalizantes de proteínas conduce a una desnaturalización del producto inmunógeno unido a los anticuerpos antiproteína transportadora, dando como resultado la liberación, en la solución de lavado, de moléculas de FNT $\alpha$  que no están unidas por enlace covalente a las moléculas de proteína transportadoras. Por consiguiente, en la etapa d2) del procedimiento, solamente se cuantifican las moléculas de FNT $\alpha$  que están unidas por enlace covalente a las moléculas de proteína transportadoras.

Preferentemente, la solución desnaturalizante tamponante utilizada en la etapa c) contiene un tensioactivo tal como Tween<sup>®</sup> 20, en una concentración final de 0,1 v/v.

En las etapas d1) y d2), las cantidades de anticuerpos unidos se miden preferentemente mediante incubación de los complejos antígeno-anticuerpos formados al final de cada una de dichas etapas con el nuevo anticuerpo que está marcado mediante una molécula detectable, respectivamente:

(i) en la etapa d1), un nuevo anticuerpo se dirige contra un anticuerpo de anti-proteína transportadora y se marca con una molécula detectable;

(ii) en la etapa d2), un nuevo anticuerpo se dirige contra un anticuerpo anti-FNT $\alpha$  y se marca con una molécula detectable.

La molécula detectable es indistintamente una molécula radioactiva, una molécula fluorescente o una enzima. Como enzima, puede utilizarse más específicamente la peroxidasa, poniéndose de manifiesto su presencia por colorimetría, después de la incubación con el sustrato orto-fenilendiamina (OPD).

Un protocolo detallado del procedimiento mencionado anteriormente se describe en los ejemplos.

A título ilustrativo, se ha derepresentado según la invención, utilizando el primer o el segundo de los métodos de cuantificación descritos anteriormente que: en el producto inmunógeno que comprende heterocomplejos entre la molécula transportadora KLH y las moléculas FNT $\alpha$  humanas, menos del 40% de las moléculas de FNT $\alpha$  están unidas por enlace covalente a la molécula transportadora KLH.

Para preparar una composición inmunógena o de la vacuna de la invención, el producto inmunógeno estable obtenido por el procedimiento según la invención se ajusta a una concentración apropiada, opcionalmente combinada con un adyuvante de la vacuna adecuado, y envasado para su utilización.

La presente invención también se refiere a una composición inmunógena que comprende (i) un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora preparada por el procedimiento dado a conocer en la presente memoria o (ii) un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora descrita anteriormente, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere también a una composición de vacuna que comprende (i) un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora preparada por el procedimiento dado a conocer en la presente memoria o (ii) un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora descrita anteriormente, en combinación con uno o más inmunoadyuvantes.

Tal como se utiliza en la presente memoria el término "adyuvante" se refiere a su significado ordinario de cualquier sustancia que aumenta la respuesta inmunitaria a un antígeno con el que se mezcla. Los adyuvantes útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, geles minerales de Freund tales como el hidróxido de aluminio, y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de la lapa californiana y dinitrofenol. BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes potencialmente útiles.

Cualquier adyuvante conocido en la técnica puede utilizarse en la composición de vacuna anterior, incluyendo los adyuvantes a base de aceite tales como el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund, adyuvantes a base de micolato (por ejemplo, dimicolato trehalosa), lipopolisacárido (LPS) bacteriano, peptidoglucanos (es decir, mureínas, mucopéptidos o glucoproteínas tales como N-Opaca, dipéptido de muramilo [DPM] o análogos de DPM), proteoglucanos (por ejemplo, extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (por ejemplo, OK432), Biostim. TM. (por ejemplo, 01K2), los "Iscoms" de las patentes EP 109 942, EP 180 564 y EP 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (tal como migliol), aceites vegetales (tal como el aceite de cacahuete), liposomas, polioles Pluronic.RTM., sistema adyuvante de Ribí (véase, por ejemplo GB-A-2 189 141), o interleucinas, particularmente las que estimulan la inmunidad mediada por células. Un adyuvante alternativo que consiste en extractos de Amycolata, un género de bacterias del orden de Actinomycetales, se ha descrito en la patente US nº 4.877.612. Además, están comercializadas mezclas de adyuvantes patentadas. El adyuvante utilizado dependerá, en parte, del organismo receptor. La cantidad de adyuvante a administrar dependerá del tipo y tamaño del animal. Las dosis óptimas pueden determinarse fácilmente por procedimientos de rutina.

Los adyuvantes adecuados comprenden, de manera no limitativa, tensioactivos, por ejemplo, hexadecilamina, octadecilamina, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N'-N-bis(2-hidroxietil-propano diamina), metoxihexadecil-glicerol, y polioles plurónicos; polianiones, por ejemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, ácido poliacrílico, carbopol, péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo, MPL, aimetilglicina, tuftsina, emulsiones de aceite, alumbre y mezclas de los mismos. Otros adyuvantes potenciales incluyen subunidades de péptido B de la toxina de *E. coli* lábil al calor o de la toxina del cólera. McGhee, J. R. *et al.*, "On vaccine development", *Sem. Hematol.*, 30:3-15 (1993).

Las propiedades adyuvantes de la saponina se conocen hace tiempo, en cuanto que tienen capacidad para aumentar los valores de anticuerpos para inmunógenos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "saponina" se refiere a un grupo de glucósidos tensioactivos de origen vegetal compuestos de una zona hidrófila (normalmente varias cadenas de azúcares) junto con una zona hidrófoba de estructura esteroide o triterpenoide. Aunque la saponina está disponible en un número de fuentes diversas, las saponinas con actividad adyuvante útil han procedido del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* (Molina). La saponina de esta fuente se utilizó para aislar una fracción "homogénea" denominada "Quil A" (Dalsgaard, K., (1974), *Arch. Gesamte Virusforsch.* 44:243).

La reactividad de la dosis en el sitio es una preocupación principal tanto para la utilización veterinaria como humana de Quil A en preparaciones de vacuna. Una manera de evitar esta toxicidad de Quil A es la utilización de un complejo inmunoestimulante (conocido como ISCOM.TM., abreviatura para Immuno Stimulating Complex (Complejo Inmunoestimulante)). Esto es principalmente porque Quil A es menos reactivo cuando está incorporado en complejos inmunoestimulantes, porque su asociación con el colesterol en el complejo reduce su capacidad para unirse al colesterol en las membranas celulares y por consiguiente sus efectos líticos celulares. Además, se requiere una cantidad menor de Quil A para generar un nivel similar de efecto adyuvante.

Las propiedades inmunomoduladoras de las saponinas de Quil A y los beneficios adicionales que se derivan de estas saponinas cuando se incorporan a un complejo inmunoestimulante se han descrito en varias publicaciones, por ejemplo, Cox y Cox, J. C. y Coulter, A. R., *Advances in Adjuvant Technology and Application in Animal Parasite Control Utilising Biotechnology*, Capítulo 4, Ed. Yong, W. K. CRC Press (1992); Cox, J. C. y Coulter, A. R. (1997) *Vaccine* 15(3):248-256; Cox, J. C. y Coulter, A. R. (1999) *BioDrugs* 12(6): 439-453; Dalsgaard, (1974) (anteriormente); Morein *et al.* (1989) "Immunostimulating complex (ISCOM)", In "Vaccines: Recent Trends and Progress". G. Gregoriadis, A. C. Allison y G. Poster (Eds.). Plenum Press, Nueva York, pág. 153; memorias de patentes australianas nº 558258, nº 589915, nº 590904 y nº 632067.

Los ISCOM clásicos se forman por combinación de colesterol, saponina, fosfolípido e inmunógenos, tales como las proteínas de la envoltura vírica, composiciones de la matriz de ISCOM (conocidas como ISCOMATRIX.TM.) están formadas idénticamente, pero sin proteínas víricas. Los ISCOM parecen estimular tanto las respuestas inmunitarias humorales como las celulares. Los ISCOM se han preparado con proteínas de varios virus incluyendo VSH-1, CMV, VEB, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la rabia y virus de la gripe, véase por ejemplo, I. G. Barr *et al.*, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 32:247-271 (1998). Se ha observado que cuando el ADN desnudo o los polipéptidos de agentes infecciosos son poco inmunógenos cuando se proporcionan por sí mismos, la inclusión en los ISCOM ha aumentado su inmunogenicidad. Varias proteínas formuladas con los ISCOM se ha derepresentado que producen CTL principalmente en modelo de roedores. Berzofsky (1991), *Biotechnol. Ther.*, 2:123-135; Hsu *et al.*, (1996), *Vaccine*

14:1159.1166; Lipford *et al.*, (1994), *Vaccine* 12:73-80; Mowat *et al.*, (1991), *Immunology* 72:317-322; Osterhaus *et al.*, (1998), *Dev. Biol. Stand.*, 92:49-58; Rimmelzwaan *et al.*, (1997), *J. Gen. Virol.*, 78 (pt.4):757-765; Sambhara *et al.*, (1998), *J. Infect. Dis.*, 177:1266-1274; Sambhara *et al.*, (1997), *Mech. Aging Dev.*, 96:157-169; Sjolander *et al.*, (1997), *Vaccine* 15:1030-1038; Sjolander *et al.*, (1998), *J. Leukoc. Biol.*, 64:713-723; Takahashi *et al.*, (1990), *Nature* 344:873-875; Tarpey *et al.*, (1996), *Vaccine* 14:230-236; Trudel *et al.*, (1987), *Vaccine* 10:107-112; Verschoor *et al.*, (1999), *J. Virol.*, 73:3292-3300; Villacres-Eriksson (1995), *Clin. Exp. Immunol.*, 102:46-52, Zugel *et al.*, (1995), *Eur. J. Immunol.*, 25:451-458.

La asociación entre un producto inmunógeno estable obtenido por el procedimiento de la invención y un adyuvante se cree que es importante para la producción óptima de respuestas inmunitarias. Se han hecho numerosos estudios que confirman esta hipótesis incluyendo el trabajo con virosomas y los ISCOM.TM. (Ennis, F. A., Crux, J., Jameson, J., Klein, M., Burt, D. y Thiphawong, J. 1999, *Virology* 259: 256-261, Zurbriggen, R., Novak-Hofer, I., Seelig, A. y Gluck, R. (2000), *Progress in lipid Research* 39: 3-18., Voeten, J. T. M., Nieuwkoop, N. J., Lovgren-Bengtsson, K., Osterhaus, D. M. E. y Rimmelzwaan, G. F., 2000. *Eur. J. Imm.* (Presentada)). Por lo general la asociación entre ISCOM.TM y antígeno se ha conseguido por incorporación de antígenos anfipáticos en la estructura de ISCOM.TM durante la formación (Morein, B., Sundquist, S. Hoglund, K. Dalsgaard, y A. Osterhaus. 1984. *Nature* 308:457). La incorporación fue mediante interacciones hidrófobas. Más recientemente los procedimientos para asociar antígenos con un complejo inmunoestimulante preformado exento de proteínas (ISCOMATRIX.TM.) utilizando quelación e interacciones electrostáticas se han alterado (solicitudes de patentes internacionales n° PCT/AU98/00080-WO 98/36772 y PCT/AU00/00110).

En determinadas formas de realización de una composición de vacuna según la invención, dicha composición de vacuna comprende, como excipientes farmacéuticos, uno o más vehículos inorgánicos cargados. Los ejemplos de vehículos orgánicos cargados que son adyuvantes adecuados para su utilización en la presente invención, comprenden de manera no limitativa, saponina, complejos de saponina, uno cualquiera o más componentes del complejo inmunoestimulante de saponina, colesterol y lípido conocido como ISCOMATRIX.TM. (por ejemplo el componente de saponina y/o el componente de fosfolípido), liposomas o emulsiones de aceite en agua. La composición y preparación de ISCOMATRIX.TM. Se describe con detalle en la solicitud de patente internacional n° PCT/SE86/00480, patentes australianas n° 558258 y n° 632067 y en la publicación de la patente europea n° 0 180 564. Más ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, los detallados en las publicaciones de Cox y Coulter, 1992, 1997 y 1999. Debe sobreentenderse que el vehículo orgánico presente puede ser natural o puede obtenerse por síntesis o por recombinación.

Las composiciones de la vacuna pueden incluir también además adyuvantes para aumentar la eficacia de la composición. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59 (Publ. PCT n° WO 90/14837) que contienen 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85 (que contienen opcionalmente varias cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no se necesite) formuladas en partículas submicrónicas, (b) SAF que contiene 10% escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurónico bloqueado, y thr-MDP (véase más adelante) microfluidizada en una emulsión submicrónica o agitada para generar una emulsión de tamaño de partícula grande, y (c) sistema adyuvante Ribi.TM. (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana procedente del grupo constituido por monofosforilipido A (MPL), dimicolato de trehalosa (DMT) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox.TM.); (3) adyuvantes de saponina, tal como Stimulon.TM. (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.); (4) adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF); (5) citocinas tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), etc.; (6) mutantes desintoxicados de una toxina bacteriana de ribosilación de ADP tal como una toxina del cólera (TC), una toxina de tos ferina (PT) o una toxina de *E.coli* lábil al calor (LT), particularmente LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; véase, por ejemplo, los documentos WO 93/13302 y WO 92/19265; (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la eficacia de la composición; y (8) micropartículas con macromoléculas adsorbidas, como se describe en la solicitud de patente internacional n° PCT/US99/17308. Se prefieren alumbre y MF59.

Tal como se mencionó anteriormente, los péptidos de muramilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normauramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Más adyuvantes para provocar una respuesta de la mucosa o generalizada contra un compuesto inmunógeno según la invención puede ser la que se describe en el libro de Vogel *et al.* (Vogel F.R., Powell M.F. y Alving C. R., "A compendium of vaccine adjuvants and excipients"; 2ª edición; Vogel F.R. y Powell MF, 1995, "A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients". En: Powell M.F., Newman M.J. eds. "Vaccine design: the subunit and adjuvants approach". Nueva York: Plenum publishing, 1995; 141-228)).

Generalmente, los adyuvantes que pueden estar comprendidos en una composición de vacuna según la invención comprenden:

- 5 (i) Adyuvantes tipo gel, tal como el hidróxido de aluminio o el fosfato de aluminio (Glenny A.T. *et al.*, 1926; *J. Phatol. Bacteriol.*; Vol. 29: 38-45; Gupta R. K. y Siber G. R., 1994; *Biologicals*; Vol. 22: 53-63);
- (ii) Adyuvantes microbianos, tales como:
- 10 - Motivos CpG de ADN (Chu R. S. *et al.*, 199; *J. Exp. Med.*; Vol. 186:1623-1631); monofosforil lípido A (Schneerson R. *et al.*, 1991; *J. Immunol.*; Vol. 147: 2136-2140); toxina del cólera (Holmgren J. *et al.*, 1993; *Vaccine*; Vol. 11: 1179-1184; Okahashi N. *et al.*, 1996; *Infect. Immun.*; Vol. 64: 1516-1525);
- 15 - Toxina de *E. coli* lábil al calor (Lycke N. *et al.*, 1992; *Eur. J. Immunol.*; Vol. 22: 2277-2281; de Haan L. *et al.*, 1996; *Vaccine*; Vol. 14: 260-266; Chong C. *et al.*, 1998. *Vaccine*; Vol. 16: 732-740);
- Toxina de tosferina (Roberts M. *et al.*, 1995; *Infect. Immun.*; Vol. 63: 2100-2108; Mu H. H. y Sewell W. A., 1994; *Immunology*; Vol. 83: 639-645);
- 20 - Dipéptido de muramilo (Ellouz F. *et al.*, 1974; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; Vol. 59: 1317-1325); Cohen L.Y. *et al.*, 1996; *Cell Immunol.*; Vol. 169: 75-84);
- (iii) Emulsión en aceite y adyuvantes a base de emulsionante, tales como:
- 25 - Adyuvante incompleto de Freund (Dhiman N. *et al.*, 1997; *Med. Microbiol. Immunol.*, (Berlin); Vol. 186: 45-51; Putkonen P. *et al.*, 1994; *J. Med. Primatol.*; Vol. 23: 89-94);
- MF59 (Dupuis M. *et al.*, 1998; *Cell Immunol.*; Vol. 186: 18-27; Kahn J.O. *et al.*, 1994; *J. Infect. Dis.*; Vol. 170: 1288-1291; Ott G. *et al.*, 1995; *Vaccine*. Vol. 13: 1557-1562);
- 30 - SAF (Allison A. C. 1998; *Dev. Biol. Stand.*; Vol. 92: 3-11; Gupta R. K. *et al.*, 1993; *Vaccine*; Vol. 11: 293-306; Byars N.E. *et al.*, 1994; *Vaccine*; Vol. 12: 200-209);
- (iv) Adyuvantes en partículas, tales como:
- 35 - Complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (Putkonen P. *et al.*, 1994; *J. Med. Primatol.*; Vol. 23: 89-94; Gupta R. K. *et al.*, 1993; *Vaccine*; Vol. 11: 293-306; Sjolander A. *et al.*, 1997; *Cell Immunol.*; Vol. 177: 69-76);
- liposomas (Richards R. L. *et al.*, 1998; *Infect Immun.*; Vol. 66: 2859-2865; Fernandes I. *et al.*, 1997; *Mol. Immunol.*; Vol. 34: 569-576);
- 40 - microesferas biodegradables (Men Y. *et al.*, 1996; *Vaccine*; Vol. 14: 1442-1450; Shahin R. *et al.*, 1995; *Infect. Immun.*; Vol. 63: 1195-1200);
- 45 - saponinas (QS-21) (Newman M. J. *et al.*, 1992; *J. Immunol.*; Vol. 148: 2357-2362; Neuzil K. M. *et al.*, 1997; *Vaccine*; Vol. 15: 525-532);
- (v) Adyuvantes sintéticos, tales como:
- 50 - copolímeros no iónicos de bloque (Hunter R. L. *et al.*, 1994; *AIDS Res. Hum. Retroviruses*; Vol. 10 (Supl. 2); S95 - S98; Newman M. J. *et al.*, 1997; *Mech. Ageing Dev.*; Vol. 93: 189-203);
- análogos del péptido de muramilo (Cohen L.Y. *et al.*, 1996; *Cell Immunol.*; Vol. 169: 75-84; Fast D. J. y Vosika G. J. 1997; *Vaccine*; Vol. 15: 1748-1752; Bahr G. M., *et al.*, 1995; *Int. J. Immunopharmacol.*; Vol. 17: 117-131);
- 55 - polifosfazeno (Payne L.G. *et al.*, 1998; *Vaccine*; Vol. 16: 92-98);
- polinucleótidos sintéticos (Johnson A. G., 1994; *Clin. Microbiol. Rev.*; Vol. 7: 277-289; Harrington D.G. *et al.*, 1979; *Infect. Immun.*; Vol. 24: 160-166); y
- 60
- (vi) citocinas, tales como:
- IFN- $\gamma$  (Odean M. J. *et al.*, 1990; *Infect. Immun.*; Vol. 58: 427-432);
- 65

- interleucina-2 (Nunberg J. *et al.*, 1989; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; Vol. 86: 4240-4243);
- interleucina-12 (Luis C. *et al.*, 1994; *Science*; Vol. 263: 235-237; Bliss J. *et al.*, 1996; *J. Immunol.*; Vol. 156: 887-894; Jankovic D. *et al.*, 1997, *J. Immunol.*; Vol. 159: 2409-2417).

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere por lo tanto a la utilización de un producto inmunógeno estable de una composición de vacuna definida anteriormente para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero incluyendo una respuesta inmunohumoral en la que los anticuerpos neutralizan las propiedades inmunosupresoras, apoptósicas o angiógenas de la citocina natural.

10

Otro objeto de la invención consiste en un procedimiento para inducir la producción de anticuerpos que neutralizan la actividad de FNT $\alpha$  natural en un mamífero, que comprende una etapa de administración a dicho mamífero (i) de una composición de vacuna dada a conocer anteriormente o (ii) un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y una proteína transportadora como la descrita anteriormente junto con uno o más inmuoadyuvantes.

15

Las composiciones de la vacuna opcionalmente pueden incluir diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables (es decir, estériles e inocuos) compatibles con la vacuna que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos. Cualquier diluyente conocido en la técnica puede utilizarse. Los diluyentes a título de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, monolaurato de polioxi-etilen-sorbitán, estearato de magnesio, hidroxibenzoato de metilo y de propilo, talco, alginatos, almidones, lactosa, sacarosa, dextrosa, sorbitol, manitol, goma de acacia, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao y aceite de teobroma.

20

Una composición de vacuna según la invención puede comprender además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, tales vehículos incluyen cualquier vehículo que no induzca el mismo la producción de una respuesta nociva al individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son por lo general macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como las proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivos. Dichos vehículos son bien conocidos por cualquier experto en la materia.

25

30

Las composiciones de la vacuna según la invención por lo general pueden contener también diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH, y similares.

35

Las preparaciones adecuadas de las vacunas de la presente invención incluyen soluciones o suspensiones inyectables, líquidas. Pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para la solución o la suspensión en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable antes de la inyección. La preparación de la vacuna puede emulsionarse. Las sustancias adicionales que pueden incluirse en un producto para su utilización en los presentes procedimientos incluyen, uno o más conservantes tales como la sal disódica o tetrasódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), mertiolato y similares.

40

Las composiciones de la vacuna opcionalmente pueden incluir diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables (es decir, estériles e inocuos) compatibles con la vacuna que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos. Puede utilizarse cualquier diluyente conocido en la técnica. Los diluyentes a título de ejemplo incluyen, monolaurato de polioxi-etilen-sorbitán, estearato de magnesio, hidroxibenzoato de metilo y de propilo, talco, alginatos, almidones, lactosa, sacarosa, dextrosa, sorbitol, manitol, goma de acacia, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao y aceite de teobroma.

45

Las composiciones de las vacunas pueden estar envasadas en formas convenientes para el suministro. Las composiciones pueden estar contenidas dentro de una cápsula, comprimido oblongo, bolsita, sello, gelatina, papeleta u otro recipiente. Estas formas de suministro se prefieren cuando son compatibles con la introducción de la composición inmunógena en el organismo receptor y, particularmente cuando la composición inmunógena se está suministrando en forma de dosis unitaria. Las unidades de dosificación pueden envasarse, por ejemplo, en comprimidos, cápsulas, supositorios o sellos.

50

55

Las formas adecuadas para utilización inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Deben ser estables en las condiciones de preparación y almacenamiento y deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser causada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico o timerosal. En muchos casos, resultará preferido incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser causada por la utilización en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

60

65

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización en filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización que proporciona un polvo del principio activo más algún ingrediente adicional deseado de la solución previamente filtrada estéril del mismo.

Cuando el compuesto inmunógeno activo según la invención está protegido adecuadamente, puede ser administrado por vía bucal, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo asimilable comestible, o puede estar incluido en una cápsula de gelatina de carcasa dura o blanda, en comprimidos o incorporada directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica bucal, el compuesto inmunógeno activo según la invención puede estar incorporado con excipientes y utilizado en forma de comprimido ingerible, comprimidos bucales, grajeas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones de vacunas deberían contener por lo menos 1% en peso de compuesto inmunógeno activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, desde luego, puede variarse y puede convenientemente estar comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto inmunógeno activo en dichas composiciones de vacunas terapéuticamente útiles, es tal que se obtenga una dosis adecuada. Las composiciones o preparaciones de vacunas preferidas según la presente invención se preparan de modo que una forma de dosis unitaria contenga entre aproximadamente 0,1 g y 2.000 mg de compuesto inmunógeno activo.

Una composición de vacuna según la invención adecuada para administración bucal puede prepararse también en forma de una solución líquida, incluyendo una formulación líquida en aerosol.

Las formulaciones líquidas en aerosol contienen el producto inmunógeno y un agente dispersante en un diluyente fisiológicamente aceptable. Las formulaciones en polvo seco en aerosol de la presente invención consisten en una forma sólida finamente dividida del producto inmunógeno y un agente dispersante. Con la formulación en aerosol líquido o en polvo seco, la formulación debe ser aerosolizada. Es decir, debe ser descompuesta en partículas líquidas o sólidas con objeto de asegurar que la dosis aerosolizada realmente alcance las membranas de la mucosa de los vasos nasales o los pulmones. La expresión "partícula de aerosol" se utiliza en la presente memoria para describir la partícula líquida o sólida adecuada para administración nasal o pulmonar, es decir, que alcance las membranas de la mucosa. Otras consideraciones, tal como la construcción del dispositivo de administración, los componentes adicionales en la formulación y las características de la partícula son importantes. Estos aspectos de administración pulmonar de un fármaco son bien conocidos en la materia, y la manipulación de las formulaciones, los medios de aerosolización y la construcción de un dispositivo para administración requieren a lo sumo experimentación de rutina por cualquier experto en la materia. En una forma de realización específica, el diámetro dinámico medio de la masa será de 5 micrómetros o inferior con el fin de asegurar que las partículas del fármaco alcanzan los alvéolos pulmonares [Wearley, L. L., *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems* 8:333 (1991)].

Los sistemas de administración del aerosol, tales como el inhalador presurizado de la dosis dosificada y el inhalador de polvo seco se dan a conocer en Newman, S. P., (Aerosols and the Lung, Clarke, S. W. y Davia, D. editores, págs. 197-22), y puede utilizarse en relación con la presente invención.

Las composiciones de vacunas según la invención pueden administrarse al paciente que ha de inmunizarse por cualquier procedimiento convencional, incluyendo, por ejemplo, por vía bucal, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal o por inyección subcutánea; por administración bucal, transdérmica, sublingual, intranasal, anal o vaginal. El tratamiento puede consistir en una sola dosis o en varias dosis durante un periodo.

La presente invención se ilustra con mayor detalle mediante las figuras y ejemplos a continuación.

### Figuras

La figura 1 consiste en un esquema que ilustra el procedimiento general para la preparación de un producto inmunógeno estable según la invención.

La figura 2 ilustra la respuesta humoral en ratones inmunizados con (A) KLH sola o (B) un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1. Abscisa: individuos; ordenada: valores de anticuerpo anti-FNT $\alpha$  de IgG.

La figura 3 ilustra la actividad neutralizante anti-FNT $\alpha$  de los anticuerpos del suero producidos por ratones inmunizados por (A) KLH sola o (B) un producto inmunógeno estable preparado tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. Cada curva corresponde al suero sanguíneo de un ratón. Abscisa: porcentaje de neutralización de la



actividad del FNT $\alpha$ ; ordenada: dilución del suero.

La figura 4 ilustra la respuesta humoral de macacos Rhesus inmunizados con (A) KLH sola, (B) 20  $\mu$ g de un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1 y (C) 80  $\mu$ g de un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1. Abscisa: días después de la primera inyección; ordenada: valores del anticuerpo anti-FNT $\alpha$  de IgG.

La figura 5 ilustra la actividad neutralizante anti-FNT $\alpha$  de los anticuerpos del suero producidos por ratones inmunizados con (A) KLH sola o (B) 20  $\mu$ g de un producto inmunógeno estable preparado tal como se da a conocer en el Ejemplo 1 y (C) 80  $\mu$ g de un producto inmunógeno estable preparado tal como se da a conocer en el Ejemplo 1. Abscisa: porcentaje de neutralización de la actividad del FNT $\alpha$ ; ordenada: dilución del suero.

La figura 6 ilustra la respuesta humoral de B6.SJL-Tg(FNT) FNT $\alpha$  hu transgénico en ratones N2 inmunizados con (A), tampón PBS de referencia, (B) KLH sola, (C) de un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1 y (D) de un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1 combinado con metotrexato. Abscisa: individuos; ordenada: valores del anticuerpo anti-FNT $\alpha$  de IgG.

La figura 7 ilustra las puntuaciones clínicas de las artritis determinadas en FNT $\alpha$  hu B6.SJL-Tg(FNT) N2 transgénico inyectado con:

- NaCl (◆);
- KLH sola (■);
- un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1; [▲]; y
- un producto inmunógeno estable preparado como se da a conocer en el Ejemplo 1 combinado con metotrexato (■)

Abscisa: días después de la primera inyección; ordenada: puntuaciones clínicas de la artritis.

La figura 8 ilustra la caracterización de FNT $\alpha$  h-quinoides.

Figura 8-a) 1: Marcadores de P.M. RPN800, 2: KLH (0,8  $\mu$ g), 3: FNT $\alpha$  h (0,8  $\mu$ g), 4: 3  $\mu$ g de quinoides cargado en SDS-PAGE al 12%. Revelado por tinción con plata o inmunotransferencia Western.

Figura 8-b) Autorradiograma: 1: marcadores de P.M.; 2: 125I-FNT $\alpha$  h; 3: quinoides marcados en FNT $\alpha$  hu; 4: quinoides marcados en KLH; 5: 125I-KLH.

Figura 8-c) Quinoides (50  $\mu$ g) filtrados en una columna de superosa 6 (10 x 300). Elución en 0,2 ml con DBPS. Se calibró previamente la columna por una serie aplicada de marcadores de P.M.

Figura 8-d) Evaluación comparativa de la actividad biológica de FNT $\alpha$  (◆) y quinoides (◇) en células 9L29. e) Unión comparativa de FNT $\alpha$  al receptor I (◆) y II (■) y quinoides al receptor I (◇) y II (□).

La figura 9 ilustra la respuesta del anticuerpo en ratones TTg y Balb/c.

Figura 9-a) Título de Ab anti-FNT $\alpha$  en el suero en quinoides, FNT $\alpha$  inactivado (iFNT $\alpha$ ) o TTg inmunizado con KLH comparado con ratón Balb/c.

Figura 9-b) a 9-e) Evaluación en ratones inmunizados con quinoides (◇) y KLH (◆)

Figura 9-b) capacidad neutralizante según la dilución en el suero,

Figura 9-c) capacidad neutralizante del suero en función del tiempo,

Figura 9-d) inhibición de la unión de FNT $\alpha$  hu del suero al receptor I,

Figura 9-e) capacidad neutralizante de IgG,

Figura 9-f) inhibición en IgG de la unión al receptor I de FNT $\alpha$ .

Régimen de inmunización 1: 2 inyecciones i.m. de 20  $\mu$ g 3 semanas separadas y refuerzo (5  $\mu$ g a las 6 semanas); 2:

2 inyecciones i.m. de 10 µg y un refuerzo de 5 µg.

La figura 10 ilustra la inmunidad mediada por células de esplenocitos de ratón a FNTα h.

5 Esplenocitos purificados de KLH (n = 3) (♦) y ratones inmunizados con quinoide (n = 2) (◇). Se inmunizaron ratones Balb/c y TTg los días 1, 8 y 29. Se realizó un refuerzo el día 90 y se extirparon los bazo en el sacrificio (día 120). Se estimularon los esplenocitos *in vitro* durante 96 h con a) FNTα h, b) FNTα murino (µFNTα) y c) antígeno de KLH. Se midió la proliferación de las células específicas por incorporación de 3H-timidina y se expresó como índice de estimulación (Figura 10-A) o IL2 (Figura 10-B) e IFN-γ (Figura 10-C) la producción en el sobrenadante del cultivo después de 44 h y 72 h respectivamente (véase el apartado Materiales y procedimiento).

La figura 11 demuestra que una vacunación con FNTα hu quinoide mejora la artritis clínica en ratones transgénicos con FNTα h.

15 Se inmunizaron ratones de siete semanas de vida los días 1, 7 y 28 con KLH-FNTα (círculos blancos) (n = 8) o KLH (círculos negros) (grupo de referencia, n = 7). Las diferencias entre los grupos eran estadísticamente significativas para cualquier parámetro:

Figura 11-a): Evolución de la ganancia de peso desde el comienzo del experimento. P < 0,05 (ANOVA);

Figura 11-b): Número de extremidades afectadas. P < 0,0001 (ANOVA);

Figura 11-c): Puntuaciones clínicas de artritis P < 0,0001 (ANOVA);

Figura 11-d): Número de casos diarios de artritis (por ciento) que presentan la regresión de la enfermedad de grupos vacunados (P < 0,01, ANOVA).

Este experimento se repitió dos veces con resultados similares.

## Ejemplos

### Ejemplos 1 a 7

#### Ejemplo 1: Procedimiento de preparación de un producto inmunógeno estable según la invención

##### A. Materiales

Tabla 1: Productos químicos y reactivos

Reactivo	Calidad	Proveedor	Detalles	Aplicación
Glutaraldehído al 25%	Calidad 1	Sigma	G5882 10 x 1 ml	PD & GMP
Formaldehído al 37%	-	Sigma	F-1635 25 ml	PD
Formaldehído al 37%	EP	Sigma	15513	GMP
Fosfato ácido disódico (anhidro)	Analar	BDH	10249	PD
Fosfato ácido disódico (anhidro)	USP	Merck	1,06585 5 kg	GMP
EDTA	Analar	BDH	10093	PD
EDTA	USP	Merck	108421 1 kg	GMP
Glicina	Analar	BDH	10119	PD
Glicina	USP	Merck	500190 1 kg	GMP
Cloruro sódico	Analar	BDH	10241	PD
Cloruro sódico	BP	Merck	116224	GMP
DMSO	99,5%	Sigma	D5879	PD
DMSO	USP	Sigma	D2438 10 ml	GMP
DPBS	-	Sigma	D8537	PD
DPBS	tbc	tbc	tbc	GMP

Tabla 2: Consumibles

Descripción	Proveedor	Aplicación
Cassettes Slide-a-Lyzer® 7 kDa MWCO (0,5-3 ml)	Perbio; 66370	Diálisis
Membranas Pellicon XL PES (5 ó 10 kDa MWCO)	Milipore; PXB010A50	Filtración en flujo tangencial
Tubos de 50 ml	Nunc; 362696	Depósito de muestra
Botella de propileno de boca ancha (150 ml)	VWR; 215-0520	Depósito de muestra
Botella de propileno de boca ancha (250 ml)	VWR; 215-5683	Depósito de muestra
Crioviales (3,5 ml y 2 ml)	Sigma; V1138; V9637	Depósito de muestra
Unidad TFF Labscale con deposito acrílico de 500 ml	Milipore; XX42LSS13	Filtración en flujo tangencial

B. Descripción del procedimiento

5 El procedimiento dado a conocer en este ejemplo ilustra una forma de realización del procedimiento según la invención para preparar un producto inmunógeno estable que comprende heterocomplejos antigénicos de FNT $\alpha$  y KLH.

10 Además, el procedimiento que se detalla a continuación está concebido para preparar un lote de 120 mg del producto inmunógeno estable.

Etapa a)

15 - Se toman 30,05 ml de FNT $\alpha$  (a 4,2 mg/ml) y se descongelan a 4°C durante la noche (NB: 126,21 mg de FNT $\alpha$  requeridos).

Etapa b) (o etapa b1) en determinadas normas de realización del procedimiento

20 - Se añaden 90,15 ml de "tampón de dilución" para obtener la solución del "tampón de operación" y FNT $\alpha$  a razón de 1 mg/ml ( $\pm$  10%).

- Tampón de dilución = fosfato ácido disódico 130 mM, NaCl 133 mM, EDTA 6,6 mM, pH 7,8.

25 - Tampón de operación = fosfato ácido disódico 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7,8.

Etapa b2)

30 - A los 120 ml restantes el FNT $\alpha$  a razón de 1 mg/ml ( $\pm$  10%) y se añaden 1,2 ml de DMSO. Mantener la mezcla a t.a. durante 30 minutos. Se mezcla por agitación cada 10 minutos y se intenta evitar la formación de espuma.

- Se añaden 61,34 ml de "tampón de operación" a la mezcla. Se mezcla suavemente invirtiendo el recipiente y se intenta evitar la formación de espuma.

Etapa c)

35 - Se añaden 51,6 mg de KLH. Nota: para una solución de 9,81 mg/ml de KLH se añaden 5,26 ml. Se mezcla suavemente invirtiendo el recipiente. El volumen total en este punto es de 187,8 ml.

Etapa d)

40 - Se diluye la solución madre al 25% de glutaraldehído hasta el 2,5% utilizando el "tampón de operación". Esto se hace inmediatamente antes de su uso.

45 - Se añaden 20,86 ml de la solución de glutaraldehído diluida al 2,5%. Obsérvese que el volumen total en este punto es de 208,56 ml. Se mezcla suavemente invirtiendo el recipiente.

- Se cierra la botella y se incuba durante 45 min. a t.a. Se invierte suavemente la botella cada 15 min.

Etapa e)

50 - Se diafiltra la solución utilizando filtración en flujo tangencial (FFT) frente al tampón de operación.

- diálisis tres veces frente a 20 volúmenes de tampón fosfato a pH 7,6 10 mM, NaCl 150 mM.

55 Volumen 1 = 2 horas

Volumen 2 = 2 horas  
Volumen 3 = toda la noche

Etapa f)

- 5
- Se diluye la solución madre de formaldehído (al 37%) 10 veces con "tampón de operación" hasta dar una solución al 3,7%. Esto se hace inmediatamente antes de su uso.
  - Se añade formaldehído diluido al 3,7% a la solución de FNT $\alpha$ -KLH para dar una concentración final del 0,2%.
- 10
- Por ejemplo, si el volumen recuperado es de 200 ml, entonces la cantidad de formaldehído al 3,7% que debe añadirse será de 11,43 ml).
- Se sella la botella y se incuba durante 6 días a 37°C. La botella se da la vuelta una vez al día.
- 15

Etapa g)

- Después de 6 días, se añade glicina 2 M (preparada en WFI) hasta una concentración final de 0,1 M. Se incuba durante 1 h a t.a. durante la cual se da la vuelta a la botella suavemente.
- 20

Etapa h)

- Se comprueba el pH de la DPBS (Sigma) que debe utilizarse para la filtración por diálisis y se ajusta si se necesita hasta un pH final de  $7,3 \pm 0,2$  utilizando NaOH 0,1 M. No es de esperar normalmente ajuste de pH.
  - Se filtra por diálisis la solución utilizando filtración en flujo tangencial (FFT) frente a DPBS.
- 25

Se utilizarán membranas de FFT MWCO de 2 x 5 kDa.

30 Se utilizará un depósito de 500 ml (acrílico en el sistema FFT de Labscale.

El material se recupera de la membrana drenando el concentrado (retenido en la ultrafiltración) en una botella de polipropileno pesada previamente.

35 **Ejemplo 2: Procedimientos de ensayo para el producto inmunógeno estable obtenido por el procedimiento según la invención**

Los procedimientos de ensayo dados a conocer en el Ejemplo 2 resultan conocidos para cualquier experto en la materia. Sin embargo, el experto en la materia puede realizar también los procedimientos de ensayo según uno o cualquiera de los procedimientos de ensayo que se dan a conocer en varios ejemplos en la presente memoria.

40

2.1. Contenido total de proteínas. Determinación por colorimetría: Ejemplo de la prueba de Bradford.

45 El contenido en proteínas se determina utilizando la técnica de Bradford (Bradford, M. *Anal. Biochem.* 1976.72, 248-254).

En resumen, se crea una curva de calibración con albúmina de suero bovino (ASB) pipeteando en una serie de tubos de ensayo 0, 10, 20, 30, 40  $\mu$ l de una solución de 0,2 mg/ml de ASB en PBS. Posteriormente, se completa el volumen de cada tubo a 500  $\mu$ l añadiendo el volumen correspondiente de agua desionizada. A cada tubo se añade a continuación 500  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Se preparan dos blancos con 200  $\mu$ l de PBS. Después de 5 min. de reacción a temperatura ambiente, el contenido de cada tubo se agita y se lee a 595 nm.

50

Se hacen reaccionar doscientos  $\mu$ l de una dilución apropiada de la solución de la proteína de ensayo con el reactivo Bradford descrito anteriormente.

55

Contenido en proteínas de FNT $\alpha$  en KLH-FNT $\alpha$ : ELISA

Cuatro muestras de KLH-FNT $\alpha$  tomadas de 4 viales se diluyen en solución salina tamponada con fosfato pH 7,2 (PBS) a razón de 5  $\mu$ g/ml: Estas diluciones se utilizan para recubrir placas de microvalorador (Costar 3590) 100  $\mu$ l por pocillo. Después de dejar que se produzca el recubrimiento durante la noche a 4°C, se lavan las placas con PBS que contiene Tween 20 al 0,1% y se saturan los pocillos con solución al 2% de suero de ternera fetal (FCS) en 100  $\mu$ l de PBS-Tween durante 2 h a 37°C. Después de lavar las placas con PBS-Tween, se pipetea 100  $\mu$ l de las diluciones en serie de un suero anti-FNT $\alpha$  en cada pocillo y las placas se incuban durante 2 h a 37°C, tras lo cual se lavan intensamente y se incuban de nuevo durante 2 h a 37°C, después de añadir a cada pocillo de 100  $\mu$ l de un antisuero anti-IgG marcado con HRP.

60

65

Después de la incubación, se lavan las placas y se añaden a cada pocillo 100 µl de solución de orto-fenilendiamina (OPD). Tres minutos después, se añaden a cada pocillo 100 µl de ácido sulfúrico 2 N y se leen las placas a 490 nm en un fotómetro multiscan.

5

## 2.2. Grado de pureza de KLH-FNT $\alpha$ de inmunógeno: IEF + inmunotransferencia Western

El grado de pureza del inmunógeno se evalúa por enfoque isoeléctrico (IEF) dejando que migre KLH-FNT $\alpha$  inmunógeno aparte KLH solo y FNT $\alpha$  sola en una placa de agarosa al 1% en un gradiente de pH de 3 a 10. Después de aplicar una dilución apropiada de cada muestra a razón de 250 µg/ml, la migración se realiza utilizando un aparato del sistema Phast (Amersham Pharmacia) en las condiciones siguientes:

10

1ª etapa (pre migración): 500 V, 2,5 mA, 2,5 W, 15°C, 5 aVh

2ª etapa (aplicación): 200 V, 2,5 mA, 2,5 W, 15°C, 5 aVh

15

3ª etapa (migración): 1.500 V, 2,5 mA, 2,5 W, 15°C, 450 aVh

Después de la migración, las proteínas se transfieren por microcapilaridad a una membrana PVDF y las proteínas se revelan por inmunotransferencia Western.

20

## Detección por inmunotransferencia Western

Se satura la membrana de nitrocelulosa empapándola durante la noche en leche al 5% con TBS Tween 20 a temperatura ambiente, tras lo cual se incuba durante 1 h con anti-FNT $\alpha$  (hu) policlonal primario o anticuerpo anti-KLH diluido en leche al 10% con TBS Tween 20 a temperatura ambiente. Posteriormente, se lava la membrana 4 veces durante 5 min. con TBS Tween 20 antes de incubarla durante 1 h con el anticuerpo marcado con HRP secundario diluido con leche al 10% en TBS Tween 20 a temperatura ambiente. De nuevo, se lava la membrana 4 veces con TBS Tween 20 y se revelan las manchas por quimioluminiscencia utilizando un kit ECL Plus (Amersham Pharmacia).

25

30

## 3. Porcentaje de enlaces covalentes de FNT $\alpha$ -KLH en el producto inmunógeno estable

### • 3.1. Procedimiento nº 1: cromatografía por exclusión de tamaño en condiciones desnaturalizantes y reductoras

La solución quinoide de ensayo se somete a condiciones desnaturalizantes (concentración final de urea 8 M) y reductoras (concentración final 5% de beta-mercaptoetanol) que conducirán a una disociación de enlaces no covalentes. La solución resultante se eluye mediante una columna de exclusión por tamaño rellena con Superdex 200<sup>TM</sup> (Pharmacia), seleccionada por su límite de fracción de 600 kDa, muy por debajo del peso molecular de KLH y montajes covalentes de KLH-FNT $\alpha$ . Únicamente las moléculas de citocina unidas por enlaces covalentes a KLH estarán presentes en el volumen de exclusión. En este último se analiza FNT $\alpha$  (antígenos específicos de FNT $\alpha$ ) utilizando una técnica de ELISA en sándwich con los anticuerpos Ab anti-FNT $\alpha$  que no tienen ninguna reacción inmunitaria cruzada con KLH. El resultado se expresa como porcentaje del valor de FNT $\alpha$  en la solución de partida, y se mide por la misma técnica ELISA. Este porcentaje es igual al % de enlaces covalentes de FNT $\alpha$ -KLH en el quinoide de FNT $\alpha$ .

35

40

45

### • 3.2. Procedimiento nº 2: ELISA en sándwich doble con lavado con Tween

Se utiliza una solución de 1 mg/ml de Ab policlonal anti-KLH en PBS (10 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM) para recubrir una placa de microvalorador (Costar, unión elevada) 100 µl por pocillo durante 2 h a 37°C. Después de 3 ciclos de lavado con PBST (PBS con Tween 20 al 0,1% v/v) se saturan pocillos durante 1 h 30 min. con PBS que contiene FCS al 2%. Se lavan otra vez los pocillos 3 veces con PBST.

50

Se añaden a continuación a los pocillos dos series idénticas de diluciones del quinoide de ensayo (10, 5, y 0,156 µg/ml) y se incuban durante 2 h. Los pocillos se lavan 3 veces con PBST, cuya acción de disociación (mediante Tween 20) elimina todas las moléculas unidas a KLH por enlace covalente, estando fijado este último KLH a los Ab de captura recubiertos con soporte. La primera serie de diluciones de ensayo se incuban con los Ab anti-KLH mientras que la segunda serie se incuban con los Ab anti-FNT $\alpha$ . Después de incubarla durante 1 h 30 min. a 37°C, se lavan los pocillos como se describió anteriormente, y a continuación se incuban con los Ab secundarios específicos acoplados con peroxidasa.

55

60

La adición de OPD, el sustrato de peroxidasa, emite una detección colorimétrica cuantitativa de los Ab anti-FNT $\alpha$  fijados, para la primera serie, y los Ab anti-KLH fijados, para la segunda serie. La relación de los Ab fijados entre las dos series proporciona el porcentaje de FNT $\alpha$  unidos por enlaces covalentes a KLH en el quinoide.

4. Actividad inmunológica del ensayo de antigenicidad de los quinoideos KLH de FNT $\alpha$ : ELISA

Este ensayo está destinado a medir la capacidad de un inmunógeno (derivado de un antígeno o de un antígeno unido a una proteína transportadora) para combinar con un anticuerpo específico con respecto al del antígeno natural. Este ensayo consiste esencialmente en un ELISA inverso.

Una serie de diluciones crecientes del inmunógeno en esta prueba se distribuyen en los pocillos de una placa microvaloradora de poliestireno. Un anticuerpo policlonal específico dirigido a la proteína que ha de analizarse se deja reaccionar con el inmunógeno inmovilizado en pocillos. Después de eliminar el exceso de anticuerpos sin reaccionar lavando la placa, el Ab inmovilizado por el inmunógeno en los pocillos se revela cuantitativamente haciéndole reaccionar con Ab marcado con HRP dirigido al primer Ab, se desarrolla el color amarillo añadiendo un sustrato apropiado que es directamente proporcional a la cantidad de proteína inmovilizada. La densidad óptica (D. O.) de cada pocillo se mide con un medidor de absorbancia de microplacas. El contenido en proteína en la muestra de ensayo se determina a partir de una curva de calibración.

5. inmunogenicidad de quinoideos

La inmunogenicidad de una preparación inmunoide es:

- 1 - su nivel de capacidad para inducir la formación de los Ab policlonales anti-FNT $\alpha$  específicos (medida *in vivo*); y
- 2 - su capacidad de neutralización. Esta última se mide *in vivo* cuantificando la capacidad del antisuero, se toman muestras del ratón inmunizado, para inhibir la actividad biológica específica de FNT $\alpha$
- 1 - Para esto, grupos de 20 ratones Balb/c de 7 semanas de vida, de 18 a 20 g de peso corporal, alojados en jaulas separadas de 5 animales, alimentados con una dieta convencional en granulados con alimento y agua a discreción se inmunizan los días 0, 7, 14 y 21 con administración intramuscular de 0,1 ml (10  $\mu$ g) de inmunógeno de ensayo en ISA 51 (emulsión 1:1 v/v en ISA 51). Se administra una inyección de refuerzo de 5  $\mu$ g de inmunógeno como 0,1 ml de una emulsión 1:1 en ISA 51 en el día 60. Se extrae una muestra de sangre 2 días antes de iniciar la inmunización por punción retroorbital y de nuevo 12 días después de la última inyección para la determinación de la concentración de anticuerpos por ELISA. Los tres ratones de muestra reciben una emulsión 1:1 v/v de PBS en IFA

Los valores de Ab en el suero se expresan como la inversa de la dilución que proporciona un D.O. > 0,3.

6. Inmunotoxicidad - *in vitro*

Ensayo de proliferación (por incorporación de 3H-timidina) de linfocitos T estimulados por antígenos PPD/TT y tratados con varias dosis de quinoide.

Los PBMC están recién aislados procedentes de donantes sanos por separación de la sangre por centrifugación con gradiente Ficoll. Se introducen las células en placas de 96 pocillos de fondo redondo, 15.000 células/pocillo en medio RPMIc con FCS al 10%. Se añade el quinoide a la concentración de 1  $\mu$ g/ml hasta 100 ng/ml, a continuación PPD o TT al 0,16%. Se dejan incubar las placas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 6 días. Se añade timidina tritiada, 0,5  $\mu$ Ci/pocillo, 18 h antes del final de la incubación. Se analiza la proliferación celular con un contador  $\beta$  de centelleo.

7. Características biológicas del bioanálisis con FNT- $\alpha$  de quinoideos KLH-FNT $\alpha$ :Citólisis de células L929 murinas en presencia de actinomicina DMateriales

- Estirpe de fibroblastos de ratón L929 (ATCC n° de cat. CCL-1) quinoide KLH-FNT $\alpha$  (murino o humano) en PBS (patrón), NEOVACS
- FNT $\alpha$  murino recombinante Peptotech (315-01A) o FNT $\alpha$  humano Peptotech (300-01A) medio de cultivo (RPMI enriquecido con FCS al 10% (suero de ternero fetal) glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina-estreptomina)
- Medio analítico (RPMI enriquecido con FCS al 2%, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina-estreptomina)
- Medio de preincubación: HL1 enriquecido con glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina-estreptomina
- Placa de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos (Costar, 3595)

- Actinomicina D, 100 µg/ml almacenada a 4°C (protegida de la luz)
- Solución de MTT (Sigma, M5655) 5 mg/ml de solución madre en alícuotas de solución madre de PBS mantenida como mínimo a -20°C (protegida de la luz)
- DMSO (SIGMA, 471267)

*Duración del experimento*

24 horas de incubación  
1 hora para preparación del ensayo

*Procedimiento*

1. Se diluye el quinoide KLH-FNT $\alpha$  murino o humano y el patrón en una serie de diluciones divididas por dos en el medio analítico en 50 µl/pocillo en placas de 96 pocillos desde la fila 2 a la 11, partiendo de la fila 1 de de Leave apropiada como blanco.
2. Se prepara la suspensión de células L929 a una densidad de 7,5 10<sup>5</sup>/ml en medio analítico enriquecido con actinomicina D a razón de 1 µg/ml (protegida de la luz). Se añaden 50 µl/pocillo de la suspensión celular a la misma placa desde la fila 1 a la 12.
3. Se incuba la placa durante 24 h a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% en una incubadora humidificada.
4. Se enjuaga 2 veces con PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>
5. Se añaden 50 µl/pocillo de solución MTT al 40% en medio analítico y se incuban durante 4 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% en una incubadora humidificada.
6. Se vacían las placas y se añaden 50 µl de DMSO a cada pocillo.
7. Se lee la placa a 550-630 nm
8. Se analizan los datos.

**Ejemplo 3**

**Estudio comparativo de varias preparaciones de quinoideos KLH-FNT $\alpha$  (humanos)**

Se han realizado varias preparaciones de un quinoide FNT- $\alpha$  humano que consisten en FNT- $\alpha$  humano acomplejado con la proteína transportadora específica KLH.

Más exactamente, varias preparaciones de KLH-FNT $\alpha$  (humanos) se han producido por el mismo procedimiento general que se da a conocer en el Ejemplo 1 pero con variaciones en (i) el porcentaje de DMSO (ii) la concentración de glutaraldehído (2,5 o 22,5 mM) así como (iii) el periodo de incubación del producto intermedio con formaldehído (desde 0,2 hasta 6 días de período de incubación).

A continuación, se ha analizado la actividad biológica del FNT- $\alpha$  humano. Además, se ha ensayado la conservación de epítomos B con configuración en el producto quinoide final mediante (i) el ensayo de citotoxicidad de FNT $\alpha$  humano en la estirpe celular L929, así como (ii) mediante los ensayos de inmunogenicidad dados a conocer en la presente memoria en este ejemplo.

A. Materiales y procedimientos

A.1 Ensayos de ausencia de actividad biológica de FNT $\alpha$  en los quinoideos KLH-FNT $\alpha$  (humanos)

FNT $\alpha$  humano, en presencia de actinomicina D, posee una actividad citotóxica sobre los fibroblastos murinos de la estirpe celular L929, actividad citotóxica que se evalúa mediante la prueba de viabilidad celular utilizando MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio. Este ensayo se basa en la reducción de MTT por la NADPH reductasa mitocondrial de las células vivas para con el producto formazán reducido que tiene un color púrpura-azul.

En este ensayo, la actividad metabólica de las células permite la evaluación de su viabilidad.

La evaluación de la actividad biológica de los quinoides KLH-FNT $\alpha$  consiste en la incubación de células L929 en presencia de cantidades decrecientes de dicho producto quinoide (50 ng/ml a 0 ng/ml) en combinación con actinomicina D (1  $\mu$ g/ml) en pocillos de fondo plano de una placa de microcultivo.

5 El cultivo celular se realiza a continuación a 37°C en atmósfera húmeda que contiene CO<sub>2</sub> al 5% durante un periodo de 24 horas.

Después de un periodo de cultivo de 24 horas, los sobrenadantes del cultivo celular se descartan y reemplazan por la solución de ensayo MTT.

10 Después de un período de incubación de 4 horas a 37°C con MTT, se elimina la solución de MTT y se añade DMSO.

Después de la homogenización se analiza la densidad óptica del sobrenadante del cultivo celular con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

15 Los resultados se expresan como densidad óptica (D.O.) a 570 nm. En paralelo, se realizan cultivos celulares incubados con un intervalo de FNT $\alpha$  de 0 a 10 ng/ml, como referencia.

20 Los resultados finales expresados en dosis letal 50, denominada también DL<sub>50</sub>, que es la dosis que produce la lisis del 50% de las células L929 cultivadas.

A.2 Ensayo para la conservación de los epítomos B con configuración de FNT $\alpha$  humanos con los quinoides KLH-FNT $\alpha$  finales (humanos), después de los tratamientos químicos con glutaraldehído y formaldehído: ensayo de inmunogenicidad

25 El estudio de conservación de la configuración de epítomos B del FNT $\alpha$  humano en los quinoides finales KLH-FNT $\alpha$  finales (humanos), después de los tratamientos químicos, se lleva a cabo mediante un ensayo de la actividad inmunógena en C57Bl/6 que pesan 18 a 20 g.

30 El día 0, se inyecta un grupo de tres ratones con 0,2 ml (50  $\mu$ g) de una emulsión en adyuvante completo de Freund (ACF) por vía intramuscular.

Se administra una segunda inyección de 25  $\mu$ g del producto quinoide en adyuvante incompleto de Freund el día 21.

35 Se lleva a cabo un muestreo de sangre retroorbital en cada ratón antes de la primera inyección y también el día 28. Se recogen sueros de cada grupo de ratones.

40 La respuesta humoral se mide por detección de los anticuerpos de isotipo IgG dirigidos contra FNT $\alpha$  humano en los sueros de los ratones inmunizados. La respuesta humoral se determina mediante un ensayo ELISA y se expresa en valores de anticuerpo (dilución<sup>-1</sup> que da una densidad óptica superior a 0,3).

La capacidad de neutralización de los sueros de los ratones inmunizados con los quinoides KLH-FNT $\alpha$  (humanos) se ha medido por el ensayo de citotoxicidad de FNT $\alpha$  en células L929, tal como se describe más adelante.

45 Las células L929 se tratan con varias diluciones de mezclas de sueros (diluciones desde 1/100 hasta 1/12.800) que se han tomado muestras el día 2 y el día 28 y a continuación se han incubado durante 40 minutos a temperatura ambiente, y después 20 minutos a 4°C con 20 ng/ml de FNT $\alpha$  humano.

Se prosigue el cultivo celular a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%, durante 24 horas.

50 Después de un periodo de cultivo células de 24 horas, los sobrenadantes del cultivo celular se eliminan y se reemplazan por solución MTT.

Después de una incubación de 4 horas a 37°C, se elimina MTT y se añade DMSO.

55 Después de la homogenización, la densidad óptica del sobrenadante del cultivo celular se analiza con un espectrofotómetro a la longitud de onda de 570 nm.

60 Los resultados se expresan como densidad óptica (D.O.) de los sobrenadantes del cultivo celular. En paralelo, se realizan cultivos celulares incubados con un intervalo de FNT $\alpha$  de 0 a 10 ng/ml, como referencia.

Los sueros que neutralizan la actividad citotóxica de FNT $\alpha$  impiden ejercer su actividad citotóxica sobre las células L929.

65 Los resultados se expresan como 50% de la capacidad de la neutralización, o CN<sub>50</sub>, que corresponde a la dilución



del suero que neutraliza el 50% de la actividad citotóxica del FNT $\alpha$  humano.

#### B: Resultados

5 La Tabla 3 a continuación da a conocer los resultados obtenidos con los quinoídes finales KLH-FNT $\alpha$  (humano) según varios tratamientos químicos.

Tabla 3

Código	Glutaraldehído (mM)	Formaldehído (día)	EDTA	DMSO (%)	DE <sub>50</sub> (ng/ml)	Valor de anticuerpo	CN <sub>50</sub>
K 1	2,5	2	5 mM	0	12,5	>64000	1/650
K 2	2,5	2	5 mM	2	20	>64000	1/600
K 3	22,5	0	5 mM	1	0,15	>64000	1/600
K 4	22,5	2	5 mM	1	200	>64000	1/750
K 5	22,5	2	5 mM	2	225	>64000	1/400
K 6	22,5	2	5 mM	5	250	>64000	1/700
K 7	22,5	6	5 mM	1	> 400	>64000	1/1200
K 8	22,5	6	5 mM	2	>400	>64000	1/300
K 9	22,5	6	5 mM	5	>400	>64000	1/350
K 10	22,5	2	0 mM	0	15	>64000	1/700

10 Como se representa en la tabla 3 anterior, los mejores resultados se obtienen con un procedimiento de preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) que conlleva un tratamiento químico (i) con DMSO a la concentración del 1% y (ii) con glutaraldehído a la concentración de 22,5 mM, a continuación (iii) con un tratamiento químico con formaldehído durante el periodo de 6 días. El producto final resultante KLH-FNT $\alpha$  (humano) está desprovisto de actividad citotóxica de FNT $\alpha$  humano e induce la producción de anticuerpos policlonales que neutralizan la actividad biológica del FNT $\alpha$  humano natural.

15 Por lo tanto, el procedimiento de preparación según la condición descrita en K7 de la tabla 3 anterior permite la inactivación de la citocina FNT $\alpha$  humana contenida en la misma por lo que conserva los epítomos B con configuración.

20 El producto final KLH-FNT $\alpha$  (humano) preparado según las condiciones denominadas "K7" en la Tabla 3 anterior es el mismo que el que se prepara según el Ejemplo 1 anterior.

25 Este mejor producto quinoide FNT $\alpha$  es el que se ha estudiado en los ejemplos siguientes, fundamentalmente en un modelo de ratón transgénico, considerando estudiar su capacidad para producir anticuerpos policlonales que neutralizan FNT $\alpha$  natural en un sistema autólogo.

#### Ejemplo 4: Estudio de la toxicidad aguda del quinoide KLH-FNT $\alpha$ (humano) en ratones

30 El objetivo del estudio consistía en definir las propiedades características de una composición de la vacuna que comprende un quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) según la invención, para ser utilizado como vacuna terapéutica de amplio espectro para su utilización en el tratamiento de caquexia cancerosa y/o de varias enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoidea, enfermedad de Crohn y psoriasis).

35 Particularmente, se han estudiado las propiedades de la composición de la vacuna en cuanto a tolerancia y ausencia de riesgo.

40 Por consiguiente, se ha realizado un primer estudio de toxicidad en ratones SWISS.

#### A. Material y procedimientos

45 Se han distribuido cuarenta y seis (46) ratones SWISS hembra en (i) un grupo de cuatro animales sin tratar y (ii) tres grupos de catorce animales que han recibido, respectivamente:

##### a) Grupo de referencia (vehículo adyuvante): n = 14

Una inyección de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por vía intramuscular (IM) situada en el muslo.

50 El grupo de referencia se utilizó para evaluar la reactividad local y general de la utilización del adyuvante en la formulación.

b) Grupo tratado (primera dosis: 2.000 veces la dosis unitaria terapéutica humana, STHD): n = 14

Una inyección de quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) por vía intramuscular (IM) situada en el muslo a razón de 50  $\mu$ g/ratón en una solución salina con tampón fosfato (PBS).

c) Grupo tratado (segunda dosis: 4.000 veces la dosis unitaria terapéutica humana, STHD): n = 14

Una inyección de quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) por vía intramuscular (IM) situada en el muslo a razón de 100  $\mu$ g/ratón en una solución salina con tampón fosfato (PBS).

d) Grupo de ratones salvajes, sin tratar, que estaban incluidos en este estudio ( n = 4)

El cálculo de la dosis se refiere a la dosis unitaria para utilización humana, que es de 80  $\mu$ g/inyección/individuo: 1 SHTD (dosis unitaria terapéutica humana), por lo tanto, 1,15  $\mu$ g/kg.

Las inyecciones del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) se han realizado el día 5 (D 5) del experimento.

La respuesta de los animales al tratamiento anterior se ha determinado según los parámetros siguientes:

a - El número eventual de muertes, el periodo inmediato y a corto plazo y el periodo a largo plazo (periodo de observación de 10 días después de la administración).

b - Reactividad local o general al tratamiento.

c - Curva que muestra el estado general y el peso de los animales hasta 10 días después de la administración del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) (D 15).

Cinco (5) días después del periodo de observación (D 20), los animales sobrevivientes se han sacrificado y se han realizado los controles siguientes.

d - Examen anatómico-patológico microscópico del músculo y la posición del punto de inyección para evaluar la tolerancia local.

e - Determinación del peso de los pulmones, corazón, hígado y bazo, como valor índice de la respuesta del órgano a la administración de las sustancias inmunoestimulantes.

## B. Resultados

Cuando se administran a ratones dosis muy elevadas (aproximadamente 4.000 veces la dosis unitaria terapéutica humana en cada ratón), el quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) no ha ocasionado ningún efecto secundario, durante el período de observación completo de 10 días, y en cada uno de los grupos ensayados, como se ilustra por:

- 1) Ninguna aparición de una muerte inmediata o a plazo medio;
- 2) ninguna reacción local en el punto de inyección, y ninguna reacción generalizada,
- 3) ningún efecto de las curvas de crecimiento de los ratones, en ninguno de los grupos ensayados.

Además, el examen macroscópico de los órganos de los animales sacrificados al final del ensayo (D 20) no ha presentado alteración del órgano ni aumento alguno en el volumen del bazo y del hígado.

Además, el peso del corazón, los pulmones, el hígado y el bazo han variado de manera similar para los grupos completos de animales ensayados.

### **Ejemplo 5 - Estudio de la inmunogenicidad del quinoide KLH-FNT $\alpha$ (humano) en un modelo de ratón transgénico apropiado para FNT (humano)**

La actividad inmunógena (humoral) de la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  comparada con la actividad inmunógena del KLH se ha estudiado en ratones B6.SJL-Tg (FNT) N 2 de 5 semanas (grupo de 10 ratones). Estos ratones han sido suministrados por Taconic Company (USA) y consisten en ratones que son transgénicos para el gen FNT $\alpha$  humano (hemigoto).

#### A. Material y procedimientos

El día 0 y el día 7, los ratones (grupo de 10 ratones) han recibido una inyección de 0,2 ml (30  $\mu$ g) de una emulsión en ISA51 por vía intramuscular. Se administró una segunda inyección de 25  $\mu$ g en ISA51 el día 28. A continuación, se realizó un muestreo de sangre retroorbital en cada ratón el día 35.

B. Resultados

1. Respuesta humoral

5 La respuesta humoral se mide por la presencia en los sueros de los ratones inmunizados de los anticuerpos tipo IgG dirigidos contra FNT $\alpha$  (humano). La respuesta humoral se determina por un ensayo ELISA y se expresa en el valor del anticuerpo (dilución<sup>-1</sup> que da una densidad óptica superior a 0,3). La figura 2 ilustra los valores del anticuerpo que se obtuvieron.

10 El suero procedente de ratones inmunizados con el producto final KLH-FNT $\alpha$  (humano) obtenido según el Ejemplo 1 posee gran cantidad de valores de anticuerpo tipo IgG, mientras que los sueros de ratones inmunizados con KLH están desprovistos de estos anticuerpos.

15 La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con el ensayo de citotoxicidad de FNT $\alpha$  en células L929. Los resultados se presentan en la figura 3.

20 Los anticuerpos producidos por la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) tienen una gran cantidad de actividad neutralizante.

**Ejemplo 6 - Estudio de la inmunogenicidad del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) en el macaco rhesus**

25 La actividad inmunógena humoral del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano), comparada con la actividad inmunógena de KLH sola, se ha estudiado en el macaco rhesus suministrado por MDS pharma (Lyon - Francia). Obsérvese que el FNT $\alpha$  que es producido de forma natural por el macaco rhesus comparte el 98,1% de homología de aminoácidos con el FNT $\alpha$  humano.

A - Material y procedimientos

30 Los días 0, 21 y 49, los macacos han recibido una inyección de 0,5 ml de una emulsión del quinoide en ISA51 por vía intramuscular, que contenía (i) 80 ó 20  $\mu$ g de la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano), o (ii) KLH sola. Se han tomado muestras de sangre en cada animal los días 28, 56 y 68.

B - Resultados

1- Respuesta humoral

35 Se ha medido la respuesta humoral detectando la presencia de anticuerpos con isótopo de IgG dirigidos contra FNT $\alpha$  humano en el suero de los macacos inmunizados. Se ha determinado la respuesta humoral con un análisis ELISA y se expresa como valores de anticuerpo (dando la dilución<sup>-1</sup> una densidad óptica superior a 0,3). Los resultados de los valores del anticuerpo obtenidos se comunican en la figura 4.

40 El suero de los macacos inmunizados con la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) tiene valores de anticuerpo con isótopo de IgG anti-FNT $\alpha$ , mientras que el suero de los macacos inmunizados con KLH sola está desprovisto de estos anticuerpos.

45 Los valores de anticuerpo anti-FNT $\alpha$  son más importantes en el suero de los macacos que han recibido 80  $\mu$ g del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano).

50 Las actividades de neutralización de los anticuerpos se han medido con el ensayo de citotoxicidad de FNT $\alpha$  en células L929. Los resultados de estos ensayos se dan en la figura 5.

Los anticuerpos producidos por el KLH-FNT $\alpha$  (humano) tienen una actividad neutralizante muy alta.

**Ejemplo 7: Evaluación de la eficacia terapéutica de la inmunización activa contra FNT $\alpha$  en ratones transgénicos con FNT $\alpha$  hu**

55 La evaluación de la eficacia terapéutica de la estrategia de inmunización activa contra FNT $\alpha$  utilizando la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) como principio activo se ha realizado en ratones transgénicos FNT $\alpha$  hu B6.SJL-Tg (FNT) N2 de 5 semanas de vida, suministrados por Taconic Company (USA). Estos ratones transgénicos con FNT $\alpha$  desarrollaron una poliartritis espontánea a la edad de 4 a 5 semanas.

## A-Materiales y procedimientos

### 1 - Inmunización

- 5 Los ratones han recibido una inyección de 0,2 ml de una emulsión en ISA51 de por vía intramuscular los días D0, D7 y D28. Se han tratado cuatro grupos de 10 ratones como se detalla a continuación:
- Grupo A: PBS: 200 µl de PBS
  - 10 - Grupo B: KLH: 200 µl de KLH
  - Grupo C: KLH-FNT: 200 µl de KLH-FNT
  - 15 - Grupo D: KLH-FNT + MTX: 200 µl de KLH:FNT y metotrexato (1 mg/kg) tres veces a la semana, empezando en la inmunización nº 1 y hasta el sacrificio (inyección intraperitoneal de 200 µl por inyección).

Los ratones han recibido (i) el día 0 y el día 7: 30 µg de la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) (ii) el día 28: 15 µg de la misma preparación.

- 20 Se tomaron muestras de sangre retroorbital en cada ratón el día 35. El día 57, a la vez que se sacrificaban los ratones, se ha realizado también una toma de muestra de sangre.

### 2 - Examen clínico y evaluación cuantitativa de la artritis

- 25 Se ha realizado un examen clínico, aún al comienzo del experimento, y después dos veces a la semana.

- Las evaluaciones fueron realizadas por un observador que no tenía conocimiento del tratamiento que se aplicó. La gravedad clínica de la artritis de cada articulación (dedos, tarso, tobillo, carpo) se cuantificó por atribución de una puntuación que varía entre 0 y 4 en la que: 0 = normal; 1 = eritema; 2 = hinchazón; 3 = deformación; y 4 = deformación mayor o necrosis. Habiéndose realizado una suma de estas puntuaciones para obtener una puntuación de la artritis en cada animal, cada día. Una media para cada grupo se calculó para cada día de tratamiento.

### 3 - Examen histológico y evaluación cuantitativa de la artritis

- 35 Se sacrificaron todos los animales 57 días después del comienzo del experimento. Las patas posteriores se han extirpado, fijado en formol, descalcificado, después deshidratado y a continuación incluido en bloques de parafina. A continuación, se realizaron secciones histológicas de 5 µm de espesor con un micrótopo. Se realizaron por lo menos cuatro secciones en serie en cada pata con objeto de asegurar una correcta evaluación espacial de las afecciones de la articulación. Las preparaciones de las secciones se tiñeron a continuación con hematoxilina y eosina y a continuación se observaron al microscopio óptico. Se evaluaron las lesiones cuantitativamente en cada sección según una escala de tres puntos (0 = normal; 3 = grave). Esta puntuación histológica puede dividirse en dos parámetros: destrucción del cartílago y del hueso (espesor del cartílago y del hueso, irregularidades y presencia de erosiones) por una parte, y por otra parte, inflamación (proliferación sinovial, infiltración celular inflamatoria).

### 4 - Estadística

Los valores de los resultados se dan como media y desviación estándar de la media (SDM). Se ha realizado una prueba de la t de Student así como un análisis de varianza (ANOVA).

## B - Resultados

### 1 - Respuesta humoral

- 55 La respuesta humoral se mide detectando la presencia de anticuerpos con isótopo de IgG dirigidos contra el FNT $\alpha$  humano en el suero de macacos inmunizados. La respuesta humoral se determina mediante un ensayo ELISA y los resultados se expresan como valor del anticuerpo (proporcionando la dilución<sup>-1</sup> una densidad óptica superior a 0,3).

Los resultados de los valores del anticuerpo que se obtuvieron se representan en la figura 6.

### 2 - Examen clínico y evaluación cuantitativa de la artritis

#### Evolución de la puntuación clínica con el tiempo

- 65 La evolución de la puntuación clínica con el tiempo se representa en la figura 7.

El tratamiento de los macacos (i) con quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) o (ii) con quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) combinado con MTX produce una mayor disminución estadísticamente significativa de las puntuaciones de la artritis que se evaluaron por examen clínico. Por comparación, las puntuaciones de la artritis determinadas para los animales de referencia tratados con KLH o con tampón PBS fueron muy inferiores.

Evaluación de la aparición de la enfermedad y parámetros de aparición de la gravedad

La evaluación de la aparición de la enfermedad y de la gravedad de la enfermedad se describen en la Tabla 4 a continuación.

- Se ha determinado, para cada animal, el día de aparición de la enfermedad mediante un examen clínico. Los animales que nunca habían desarrollado la enfermedad no fueron considerados.
- La puntuación "A MAX" corresponde a la puntuación máxima alcanzada por cada animal durante el experimento. La puntuación "A MAX" representa un parámetro de gravedad de la enfermedad.
- La incidencia significa el número de animales que han desarrollado artritis antes del final del experimento, teniendo en cuenta el número total de animales en cada grupo.

Tabla 4

Tratamiento	Días de aparición de la enfermedad (animales enfermos solamente)	Puntuaciones Amax $\pm$ desv. std	Incidencia
PBS	24,4 $\pm$ 2,5	11,5 $\pm$ 4,2	10/10
KHL	25,9 $\pm$ 2,5	9,0 $\pm$ 1,4	10/10
KLH/FNT	45 $\pm$ 2,3**/###	0,9 $\pm$ 0,5 **/#	3/10
KLH/FNT	43,5 $\pm$ 3,3 */###	1,0 $\pm$ 0,32 **/#	6/10

\*p < 0,01 vs KLH \*\*p < 0,001 vs KLH #p < 0,02 vs PBS  
###p < 0,001 vs PBS (prueba de la t de Student)

Los resultados demuestran que el tratamiento con KLH-FNT $\alpha$  y con KLH-FNT $\alpha$ +MTX produce, de manera estadísticamente significativa:

- un retraso en la aparición de la artritis, en comparación con los animales de referencia tratados por KLH sola o por PBS.
- una disminución en la gravedad de la artritis; y
- una disminución en el número de animales enfermos.

3 - Examen histológico y evaluación cuantitativa de la artritis

Los resultados se representan en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Tratamiento	Puntuaciones de inflamación $\pm$ sem	Puntuaciones de destrucción $\pm$ sem
PBS	1,30 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,11
KLH	1,53 $\pm$ 0,21	1,10 $\pm$ 0,23
KLH/FNT	0,16 $\pm$ 0,09**	0,08 $\pm$ 0,03**
KLH/FNT	0,24 $\pm$ 0,09**	0,21 $\pm$ 0,12*

\*p < 0,01 vs KLH y vs PBS \*\*: p < 0,001 vs KLH y vs PBS (prueba de la t de Student)

El tratamiento con KLH-FNT y KLH-FNT + MTX produce, de manera estadísticamente significativa, una disminución en las alteraciones histológicas (parámetro de destrucción e inflamación de la articulación).

C - Conclusión

La vacunación de los ratones transgénicos con FNT $\alpha$  hu con la preparación quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano) según el Ejemplo 1 protege claramente los animales de la inflamación y destrucción de la articulación, como evidencian los resultados de los análisis clínicos e histológicos.

Los grupos de animales tratados con la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano), en cuanto a la protección de la articulación, no pueden distinguirse de los grupos de animales tratados con la preparación del quinoide KLH-FNT $\alpha$

(humano) combinada con MTX. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la mayor eficacia del quinoide KLH-FNT $\alpha$  (humano), solo enmascara, en estas condiciones experimentales el efecto beneficioso consiguiente de MTX.

5 Los grupos de animales tratados con KLH no pueden distinguirse de los grupos de animales tratados con el tampón PBS.

Los resultados adicionales en relación con las propiedades biológicas del producto inmunógeno estable según la invención se dan a conocer en los Ejemplos 8 a 12 a continuación.

10

## **Ejemplos 8 a 12**

### A. Materiales y procedimientos de los Ejemplos 8 a 12

#### 15 A.1. Reactivos

KLH se adquirió en Intracel (San Diego, CA), FNT $\alpha$  h en Boehringer Ingelheim (Mannheim, Alemania), FNT $\alpha$  murino en Cytolab (Rehovot, Israel), RI y RII receptores de FNT $\alpha$  h, FNT $\alpha$  h, kit ELISA para IL2 murina e IFN $\gamma$  murina en R&D system (Lille, Francia), adyuvante ISA51 de Seppic (Paris, Francia).

20

#### A.2. Animales

Se adquirieron ratones transgénicos FNT $\alpha$  heterocigóticos hembra y macho de 4 a 5 semanas de vida (1006-T) en Taconic, ratones C57Bl/6 y Balb/c hembra de 6 a 8 semanas de vida en Charles River (L'Arbresles, Francia). Se mantuvieron los ratones en condiciones exentas de patógenos. Los conejos se mantuvieron en apareamiento en Charles Rivers (L'Arbresles, Francia) y *Macaca mulata* en MDS Pharma Inc. (St.-Germain-sur-L'Arbresles, Francia).

25

#### A.3. Preparación de inmunógeno

El inmunógeno FNT $\alpha$ -h-KLH se preparó realizando el procedimiento dado a conocer en el Ejemplo 1.

30

#### A.4. SDS/PAGE, tinción con plata e inmunotransferencia

El análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras se realizó según Laemmli, (Laemmli, U.K. (1970), *Nature* 227: 680-85). En un SDS al 12%-PAGE, las proteínas se revelaron autorradiografía con tinción con plata (es decir Le Roy F., Bisbal C., Silhol M., Martinand C., Lebleu B. & Salehzada T. (2001). *The Journal Biological Chemistry*, 276: 48473-482.) o análisis de inmunotransferencia utilizando los anticuerpos necesarios.

35

#### A.5. Cromatografía por filtración en gel

Se cargó el heterocomplejo en una columna de filtración en gel Superose 6 10/300 GL (Amersham bioscience, Orsay, Francia) preequilibrada con DPBS y eluida con el mismo tampón utilizado para el equilibrio a razón de 0,2 ml/min.

40

#### A.6. Cultivos celulares

La estirpe de células L929 de ratón (ATCC, CCL 1) se cultivó en medio RPMI-1640 que contenía FCS al 10%. Se volvieron a poner en suspensión esplenocitos murinos purificados en medio RPMI que contenía FCS al 5% y 2- $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M y se incubaron en medio de cultivo con o sin antígenos de KLH (30  $\mu$ g/ml), FNT $\alpha$  h (3  $\mu$ g/ml) y FNT $\alpha$  murino (1  $\mu$ g/ml).

50

#### A.7. Ensayo de proliferación de linfocitos T

Se cultivaron esplenocitos activados por antígenos durante 4 días y a continuación se pulsaron durante 18 h con 3H-timidina. Se recogieron las células 18 h después en filtro con esterillas, e incorporación de timidina en ADN se cuantificó utilizando un contador beta. El índice de estimulación se expresó como: [(media de cpm de las células estimuladas)-(media de cpm de las células sin estimular)]/(media de cpm de las células sin estimular). Los valores de SI superiores a 2 se consideraron positivos.

55

#### A.8. Ensayos con FNT $\alpha$ y receptores

60

##### A.8.1. Ensayo directo de unión del receptor

El heterocomplejo y FNT $\alpha$  hu que se unen a sus receptores diana se determinaron utilizando placas recubiertas previamente con 50 ng/pocillo de RI o RII de FNT $\alpha$  h. La dilución en serie de las muestras se incubó con su receptor

65

y se detectó el FNT $\alpha$  hu unido utilizando Ab anti-FNT $\alpha$  h policlonal en cabra biotinilado (R&D Systems). Para evaluar la capacidad del suero o de IgG para inhibir la unión de FNT $\alpha$  h a su receptor, se pretrató FNT $\alpha$  h en primer lugar con dilución en serie de sueros probados o IgG antes de ser transferido a la placa en la que se inmovilizó RI de FNT $\alpha$  h. El valor de bloqueo se expresó como el recíproco de la dilución del suero que neutraliza el 50% de la unión de FNT $\alpha$  h.

#### A.8.2. Ensayo para valoración del Ab-Anti-FNT $\alpha$ h

Se determinó el título del Ab anti-FNT $\alpha$  h específico en el suero de ratones inmunizados y de referencia mediante un ELISA directo. Placas ELISA recubiertas previamente con 50 ng/pocillo de FNT $\alpha$  hu se incubaron con soluciones en serie de sueros de ratones inmunizados y de referencia. Se detectó IgG específica utilizando IgG antirratón en conejo con peroxidasa (Zymed, CA). Los valores del punto final se expresaron como el recíproco de la dilución de la muestra más alta que da una D.O. de 0,3.

#### A.8.3. Cuantificación de citocinas

Se determinaron FNT $\alpha$  h, IL-2 murina e IFN $\gamma$  murina en el suero y el sobrenadante del cultivo por ELISA.

#### A.9. Bioanálisis de FNT $\alpha$ h

Se evaluó la actividad de FNT $\alpha$  h utilizando el ensayo de citotoxicidad de L929 (Bloquel 2004). La dilución en serie de FNT $\alpha$  h y del heterocomplejo se incubaron durante 18 h con células L929 en presencia de actinomicina D (1  $\mu$ g/ml) y el número de células sobrevivientes se determinó mediante el ensayo MTT. La capacidad del suero hiperinmune o de IgG para neutralizar la actividad de FNT $\alpha$  h se determinó asimismo después de incubarlo en el suero e IgG con FNT $\alpha$  h. El valor de neutralización se expresó como la recíproca de la dilución del suero que neutraliza el 50% de la actividad de FNT $\alpha$  h.

#### A.10. Inmunización

Se inmunizaron animales 3 ó 4 veces mediante inyecciones i.m. de quinoide con adyuvante ISA51 (Seppic) o preparación de referencia (5 a 30  $\mu$ g). Se recogieron sueros 8 a 12 días después de la 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> inmunización y en el sacrificio.

#### A.11. Purificación del anticuerpo

Se purificaron inmunoglobulina (IgG) y anticuerpos anti-FNT $\alpha$  h o anti-KLH específicos procedentes de ratones inmunizados o de referencia utilizando un kit de purificación de proteína G IgG (Pierce) o cromatografía por afinidad en columnas Sepharose 4B acopladas con FNTh o KLH (Sigma Chemical, Co., St. Louis, Mo). Se determinó la avidéz utilizando tecnología de BIAcore 3000 (Lofas, S., Johnsson B. (1990) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21: 1526; Karlsson, R., Falt, A., (1997), *J. Immunol. Methods* 200: 121).

#### A.12. Choque letal

Se sometieron los ratones de referencia e inmunizados con quinoide FNT $\alpha$  h (C57Bl/6 o TTg) a prueba de provocación IP con FNT $\alpha$  h en presencia de 20 mg de D-galactosamina en PBS 10 días después de la última inyección de inmunización. Se administró una dosis letal de partida del 80 al 90% de FNT $\alpha$  h. Los animales supervivientes se registraron 24 horas después de la inyección (Lehmann V., *J. Exp. Med.*, 1997, 657). En estos experimentos, se realizó un análisis macroscópico del hígado en un subgrupo de ratones sacrificados 8 horas después de la administración de FNT $\alpha$ .

#### A.13. Seguimiento de la artritis

Los ratones 1006-T transgénicos con FNT $\alpha$  humano desarrollan una artritis espontánea en la 8<sup>a</sup> semana de vida, como cepa Tg197 (Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D. & Kollias, G. (1991) *Embo. J.* 10, 4025-31). Se realizó un seguimiento a los ratones para las pruebas de artritis en la cuatro patas utilizando un procedimiento a ciegas. En cada pata, se puntuó la gravedad clínica desde 0 (normal) a 3 (inflamación grave con deformación) (Williams, R. O., Feldmann M. & Maini, R. N. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 9784-8; Thwin, M. M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K.; Satish, R. L., Mahendran, R. & Gopalakrishnakone, P. (2004) *Arthritis Res. Ther.*, 6, R282-94). Se calculó en cada grupo de tratamiento la puntuación media de la artritis en cada día de observación clínica. Para análisis histológico, se diseccionaron las patas libres y se procesaron como se describe en cualquier otra parte (Bessis, N., Guery, L., Mantovani, A., Vecchi, A., Sims, J. E., Fradelizi, D. & Boissier, M. C. (2000) *Eur. J. Immunol.*, 30, 867-75). Se cortaron secciones extensas en cada pata y se examinaron por lo menos cuatro. Se evaluaron a ciegas las lesiones en cada articulación en la rodilla, tobillo y pie, tal como se describió anteriormente utilizando una escala de cuatro puntos (0-3, donde 0 es normal y 3 grave) ya sea para sinovitis (proliferación sinovial, infiltración celular inflamatoria) o destrucción de la

articulación (espesor de hueso y cartilago e irregularidad y presencia de erosiones) (Saidenberg-Kermanac'h, N.; Corrado, A., Lemeiter, D., de Vernejoul, M. C., Boissier, M. C. & Cohen-Solal, M. E. (2004) *Bone*, 35, 1200-7. Miellot, A., Zhu, R., Diem, S., Boissier, M. C., Herbelin, A. & Bessis, N. (2005) *Eur. J. Immunol.*, 35, 3704-13).

#### 5 A.14. Análisis estadístico.

Todas las estadísticas se realizaron utilizando el programa informático StatView versión 5.0. Se utilizó ANOVA para analizar mediciones repetidas tales como las puntuaciones clínicas, el número de extremidades afectadas, la ganancia de peso o el número de casos. Para comparación de los datos cuantitativos, se utilizó la prueba de Mann Whitney no paramétrica. Se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  con corrección de Yates para comparar los datos cualitativos.

#### 10 B. Resultados de los Ejemplos 8 a 12

#### 15 **Ejemplo 8: Propiedades biológicas del producto inmunógeno estable (quinoide FNT $\alpha$ h)**

##### A. Caracterización inmunobioquímica

El quinoide FNT $\alpha$  humano es un heterocomplejo KLH-FNT $\alpha$  h que migró en SDS-PAGE en forma de 3 bandas que presentan pesos moleculares (P.M.) de aproximadamente 250, 105 y 40 kDa (Figura 8-a). Una proporción bastante grande del quinoide no migró y se observa a nivel del apilamiento del gel. Se identificaron tanto FNT $\alpha$  h como KLH con anticuerpos específicos (Figura 8-a).

Un diagrama similar de migración se obtuvo con el quinoide marcado con  $^{125}\text{I}$  en KLH o FNT $\alpha$  h como se muestra en la Figura 8-b. Se resolvieron cuatro picos en filtración en gel de Superosa 6. Un pico estaba en el volumen de exclusión mientras que los otros 3 eran de pesos moleculares 440, 158 y 13,7 kDa (Figura 8-c).

##### B. Ausencia de bioactividad de FNT $\alpha$

El quinoide estaba desprovisto de cualquier citotoxicidad provocada por FNT $\alpha$  tal como se evaluó mediante la prueba convencional de L929 incluso a concentraciones más elevadas (Figura 8-d).

El quinoide FNT $\alpha$  humano unido tanto al receptor I de FNT $\alpha$  h (p55) como al receptor II (p75) a pesar de su carencia deseable de bioactividad (Figura 8-e).

#### 35 **Ejemplo 9: Producción de anticuerpos anti-FNT $\alpha$ en ratones transgénicos para FNT $\alpha$ humano (ratones TTg)**

En la inmunización de ratones TTg con quinoide FNT $\alpha$  se produjeron valores elevados de los Ab anti-FNT $\alpha$ , mientras que la inmunización con FNT $\alpha$  inactivado o con KLH de referencia no pudo producir ningún Ab anti-FNT $\alpha$  detectable. Por el contrario en los ratones Balb/c tanto la inmunización con quinoide como con FNT $\alpha$  inactivado produjo los Ab anti-FNT $\alpha$  (Figura 9-a). En los ratones TTg y Balb/C, KLH pero también inmunizaciones quinoideas dieron como resultado la generación de los Ab anti-KLH (no mostrada). Como se evalúa mediante las pruebas de citotoxicidad de L929 convencionales, el suero hiperinmune a alta dilución procedente de ratones TTg inmunizados con quinoide, neutralizó la bioactividad de FNT $\alpha$  incluso a alta dilución, mientras que no se produjo ningún efecto de los sueros de los ratones inmunizados con KLH (Figura 9-b). La actividad estuvo en el máximo 2 a 4 semanas tras el refuerzo, disminuyó notablemente (> de 50%) en 3 meses (Figura 9-c) y bloqueó la unión de los receptores R1 y R2 de FNT $\alpha$  (Figura 9-d). Los Ab anti-FNT $\alpha$  h pertenecían principalmente a IgG1 (52%) y a IgG2a (48%). Había cantidades insignificantes de IgG3, IgM e IgE, medidas por kits ELISA de isotipado. Por último IgG purificada procedente de sueros hiperinmunes presentan gran afinidad por FNT $\alpha$  hu con KD que oscila entre  $5 \times 10^{-8}$  M a  $10^{-10}$  M evaluada por tecnología Biacore y bloqueó la unión de FNT $\alpha$  hu a sus receptores I y II (Figura 9-f). Estos resultados explican porqué el FNT $\alpha$  hu circulante no se detectó en los sueros de ratones inmunizados en contraste con su presencia en ratones no inmunizados a razón de 9 pg/ml.

#### 50 **Ejemplo 10: Seguridad del producto inmunógeno estable (quinoide FNT $\alpha$ h)**

La administración de dosis elevadas de quinoide FNT $\alpha$  (hasta de 100  $\mu\text{g}$ ) no generaba efectos secundarios clínicos locales o generales en diferentes cepas de ratones (Balb/c; C57Bl/6, Swiss), conejos o monos (*Maccaca mulata*). Además, mientras que FNT $\alpha$  hu natural administrado a ratones C57Bl/6 tratados con D-galactosamina produjo la muerte a las 24 horas (8 de cada 8 ratones) no se produjo ningún efecto del quinoide FNT $\alpha$  h. Además, la inmunización con quinoide no produjo efectos adversos incluyendo la respuesta indeseable autoinmune celular anti-FNT $\alpha$  h y el retraso del crecimiento a largo plazo y la supervivencia de los ratones TTg inmunizados.

El cultivo *in vitro* de esplenocitos procedentes de ratones TTg inmunizados con quinoide no desencadenó ninguna respuesta inmunitaria mediada por células al propio FNT $\alpha$  h, como se prueba por la proliferación de linfocitos T y por la producción de citocinas (IL-2 e IFN $\gamma$ ) en los sobrenadantes del cultivo (Figura 10 (A, B, C)-a). Por el contrario los ratones Balb/c inmunizados con quinoide presentaban inmunidad notable mediada por células a los FNT $\alpha$  hu



heterólogos en comparación con los animales de referencia no inmunizados (no representado). Ninguna respuesta celular a FNT $\alpha$  pudo detectarse en los ratones inmunizados comparados con las referencias (Figura 10 (A, B, C)-b). Por último, en los ratones TTg inmunizados se observó que una respuesta de los linfocitos T positivos al antígeno de KLH, igual a la de los animales de referencia que reciben KLH no presentaba ningún efecto clínico detectable (Figura 10 (A, B, C)-c).

El crecimiento de los ratones inmunizados con quinoide (n = 8), medido por el peso corporal, era comparable al de los animales de referencia no inmunizados (n = 7) hasta 50 días después de la inmunización pero llegó a ser significativamente mejor en las etapas posteriores (Figura 11-a). Se sacrificaron los ratones a los 120 días tras la inmunización para un estudio histológico comparativo de tejidos de la articulación. Se continuó haciendo seguimiento en otros grupos de ratones TTg con objeto de observar la evolución clínica de sus artritis. Entre estos animales, se sacrificaron los de referencia (n = 3) a los 150 días a causa de la gravedad de sus artritis. En cambio los 3 ratones TTg inmunizados con el quinoide FNT $\alpha$  h han permanecido libres de artritis grave (hace más de 210 días).

**Ejemplo 11: Prevención del choque letal con FNT $\alpha$ -galactosamina neutralizando anticuerpos producidos por vacunación con un producto inmunógeno estable (FNT $\alpha$  h quinoide)**

La administración intraperitoneal de FNT $\alpha$  puede desencadenar en presencia de galactosamina un choque letal en ratones. El efecto depende de la dosis. Como se muestra en la Tabla 1 en ratones C57Bl/6 el choque letal sucedió a una dosis de 11  $\mu$ g y en ratones TTg la muerte se realizó a una dosis de a lo sumo 1  $\mu$ g.

Todas los ratones de referencia no vacunados murieron pero ninguno de los ratones C57Bl/6 inmunizados con el quinoide FNT $\alpha$  h tratados con 11  $\mu$ g de FNT $\alpha$  h (Tabla 6). Es de destacar que los animales inmunizados no solamente resistieron el choque letal, además continuaron estando clínicamente sanos. Por otra parte, una administración repetida de FNT $\alpha$  h-galactosamina a intervalos de un mes no produjo ningún efecto (no representado).

Significativamente, los ratones TTg inmunizados con quinoide, resistieron también el choque letal dependiente de FNT $\alpha$  h, mientras que los ratones TTg de referencia murieron (Tabla 6). La administración de dosis más elevadas de FNT $\alpha$  h (2  $\mu$ g) no tuvo ningún efecto sobre los ratones TTg inmunizados con FNT $\alpha$  h quinoide (Tabla 6). Estos animales sobrevivieron después de un choque repetido de FNT $\alpha$  h después de 2 semanas y permanecieron totalmente sanos hasta la fecha.

En los ratones inmunizados la protección contra el choque fue debida a los Ab anti-FNT $\alpha$  h neutralizantes. Mientras que los ratones C57Bl/6 que reciben IgG no específica (1 mg) una hora después de la administración de FNT $\alpha$  (11  $\mu$ g)-D-galactosamina murieron en 24 horas, sobrevivieron los ratones administrados con IgG policlonal purificada específica de suero hiperinmune (P < 0,001 vs. grupo de referencia). En estos experimentos un subgrupo adicional de referencia y los ratones inmunizados se sacrificaron 8 h después de la administración de FNT $\alpha$  h, y el análisis orgánico macroscópico presentó atrofia del hígado en los ratones de referencia pero no en los inmunizados (P < 0,02 vs. la referencia). (Tabla 7).

**Ejemplo 12: La vacunación con un producto inmunógeno estable (quinoide FNT $\alpha$  hu) protege a los ratones TTg del desarrollo de artritis**

Se vacunaron siete ratones TTg de siete semanas de vida con KLH/quinoide FNT- $\alpha$  y se controlaron durante un periodo de 120 días. Los grupos de referencia estaban constituidos por ratones tratados con KLH y ratones tratados con solución salina, y ninguno de ellos afectados por artritis. Todos los ratones de referencia desarrollaron poliartritis con inflamación y deformaciones de la articulación (Figura 11), mientras que los ratones vacunados con el quinoide presentaban solamente la enfermedad articular marginal (P<0,0001) (Figura 4-c), con una demora en el comienzo de los signos clínicos (P<0,05), baja puntuación del índice clínico máximo (p<0,01) (Tabla 8)) y una enfermedad manifiestamente menos difusa y muchas menos extremidades afectadas (P<0,0001) (Figura 11-b). Aunque todos los animales desarrollaron artritis clínica, la enfermedad retrocedió solamente en el grupo inmunizado con FNT- $\alpha$  quinoide (Figura 11-d); el día 120, todos los animales excepto uno fueron protegidos en el grupo tratado (Tabla 8), al contrario que el grupo de referencia (P<0,001).

La evaluación histológica presentó una franca reducción de la inflamación y de la destrucción de la articulación en los animales tratados que presentaban bajas puntuaciones histológicas (P<0,01) (Tabla 8); por el contrario, los ratones de referencia presentaban pruebas significativas de artritis, con sinovitis proliferante e infiltrado celular con células mononucleares y polimorfonucleares, asociadas a erosiones del cartilago y huesos. La incidencia de la sinovitis histológica o de la destrucción se redujo de manera significativa en ratones tratados con quinoide FNT $\alpha$ -quinoide (Tabla 8).

Tabla 6. Choque letal dependiente del quinoide FNT $\alpha$

FNT $\alpha$  h en presencia de D-galactosamina se administró por IP en 0,1 ml de PBS 10 días después del último refuerzo a ratones de referencia y a ratones C57Bl/6 y TTg inmunizados con quinoide. La prevención del choque letal evaluado por supervivencia de animales después de 24 horas se observó sólo en ratones inmunizados. \*P < 0,01 vs. referencia ( $\chi^2$ )

	FNT $\alpha$ h ( $\mu$ g/ratón)	Supervivencia de ratones a las 24 horas (vivos /totales)			
		C57Bl/6		TTg	
		Referencia	inmunizados	Referencia	inmunizados
Experimento 1	1	6/6	6/6	0/6	6/6*
Experimento 2	11	0/6	6/6	no realizado	no realizado
"	2	6/6	6/6	no realizado	6/6
"	1	6/6	6/6	0/6	6/6*

Tabla 7. Neutralización del choque dependiente de FNT $\alpha$  por IgG hiperinmune

5

Grupos de ratones recibieron D-galactosamina y FNT $\alpha$  h por IP en 0,1 ml de PBS 30 min. antes de la inyección IV de IgG purificada con proteína G en ratones de referencia y ratones C57Bl/6 inmunizados con quinoide \*P < 0,001 vs. referencia ( $\chi^2$ ). †P < 0,02 ( $\chi^2$ )

	FNT $\alpha$ h ( $\mu$ g/ratón)	Supervivencia de ratones a las 24 horas (vivos /totales)	Atrofia del hígado
Ratones de referencia	11	0/10	5/5
Ratones inmunizados con FNT-quinoide	11	10/10*	0/5†

Tabla 8. Puntuaciones clínicas e histológicas de la artritis en FNT- $\alpha$  quinoide. Ratones vacunados (KLH-FNT) y de referencia (KLH) el día 120

Inmunización	Animal	Evaluación clínica						
		Artritis			Inflamación		Destrucción	
		Comienzo (días)	Puntuación Amax	Nº de casos	Puntuación	Nº de casos	Puntuación	Nº de casos
KLH	7	36,1 $\pm$ 4,5	8,6 $\pm$ 0,6	7	1,5 $\pm$ 0,1	7	1,2 $\pm$ 0,1	7
KLH-FNT	8	49,5 $\pm$ 3,2*	1,4 $\pm$ 0,2†	1‡	0,1 $\pm$ 0,1†	0‡	0,1 $\pm$ 0,1†	1‡

Incidencia de la inflamación/destrucción evaluada por histología es el número de ratones con una puntuación inflamación/destrucción  $\geq$  0,5. Amax.: puntuación clínica máxima de la artritis. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs. KLH, † p < 0,01 vs. KLH, ‡ p < 0,001 vs. KLH ( $\chi^2$ )

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para preparar un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$ , que comprende las etapas siguientes:
- 5 a) proporcionar una solución líquida que contiene FNT $\alpha$ ;
- b) añadir EDTA a dicha solución líquida que contiene FNT $\alpha$  de la etapa a);
- 10 c) añadir una proteína transportadora a la solución líquida obtenida al final de la etapa b);
- d) añadir glutaraldehído a una mezcla líquida obtenida al final de la etapa c);
- e) eliminar el glutaraldehído y las moléculas libres tanto de FNT $\alpha$  como de dicha proteína transportadora de la solución obtenida al final de la etapa d);
- 15 f) añadir formaldehído a la solución líquida obtenida al final de la etapa e), y mantener la presencia de formaldehído durante un periodo comprendido entre 96 horas y 192 horas;
- g) añadir un reactivo que bloquea la reacción con formaldehído a la solución líquida obtenida al final de la etapa f); y
- 20 h) eliminar el formaldehído y el reactivo de bloqueo de la solución líquida obtenida al final de la etapa h), con el fin de obtener una solución líquida que contiene dicho producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$ .
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa b) comprende las etapas siguientes:
- b1) añadir EDTA a dicha solución líquida que contiene FNT $\alpha$  de la etapa a); y
- b2) añadir DMSO a la solución líquida obtenida al final de la etapa b1).
- 30 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la etapa d) comprende las etapas siguientes:
- d1) añadir glutaraldehído a la mezcla líquida obtenida al final de la etapa c); y
- 35 d2) añadir EDTA a los heterocomplejos entre FNT $\alpha$  y dicha proteína transportadora obtenida al final de la etapa d1).
- 40 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa a) la concentración de FNT $\alpha$  está comprendida entre 0,1 mg/ml y 50 mg/ml.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa a) la concentración de FNT $\alpha$  está comprendida entre 0,5 mg/ml y 10 mg/ml.
- 45 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la etapa b) la concentración de EDTA está comprendida entre 1 mM y 500 mM.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que en la etapa b2) la concentración de DMSO está comprendida entre 0,5% v/v y 20% v/v.
- 50 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que en la etapa c) la relación molar de FNT $\alpha$  a dicha proteína transportadora está comprendida entre 5:1 y 100:1.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en la etapa d) la concentración final de glutaraldehído está comprendida entre 0,05% p/p y 0,5% p/p.
- 55 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que en la etapa d2) la concentración final de EDTA está comprendida entre 1 mM y 10 mM.
- 60 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que en la etapa e) el glutaraldehído se elimina realizando una diálisis, realizando una ultrafiltración con filtración por diálisis o realizando una filtración en flujo tangencial (FFT).
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la etapa f), la concentración lineal

de formaldehído está comprendida entre 1% p/p y 10% p/p.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que en la etapa f), la concentración lineal de formaldehído está comprendida entre 2% p/p y 5% p/p.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que en la etapa f) la presencia de formaldehído se mantiene durante un periodo de tiempo comprendido entre 120 horas y 168 horas.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que en la etapa g), el reactivo de bloqueo consiste en glicina.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que en la etapa g) la concentración final de glicina está comprendida entre 0,01 M y 10 M.

17. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que en la etapa g) la concentración final de glicina está comprendida entre 0,05 M y 2 M.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que en la etapa g), el reactivo de bloqueo consiste en lisina.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que en la etapa g) la concentración de lisina final está comprendida entre 0,01 M y 10 M.

20. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que en la etapa g) la concentración de lisina final está comprendida entre 0,05 M y 0,5 M.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que en la etapa h), el formaldehído y el agente de bloqueo se eliminan realizando una diálisis, realizando una ultrafiltración con filtración por diálisis, o realizando filtración en flujo tangencial (FFT).

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que dicha proteína transportadora se selecciona de entre el grupo constituido por la vacuna antidiftérica (DT) y sus mutantes, la vacuna antitetánica (TT), hemocianina de la lapa californiana (KLH), y la proteína purificada derivada de la tuberculina (PPD), OMPC de *N. meningitidis*, la proteína purificada derivada de la tuberculina (PPD), la albúmina del suero bovino (ASB) y la proteína D de *Haemophilus influenzae*.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dicha proteína transportadora consiste en la hemocianina de la lapa californiana (KLH).

24. Procedimiento para preparar una composición de vacuna que comprende las etapas siguientes:

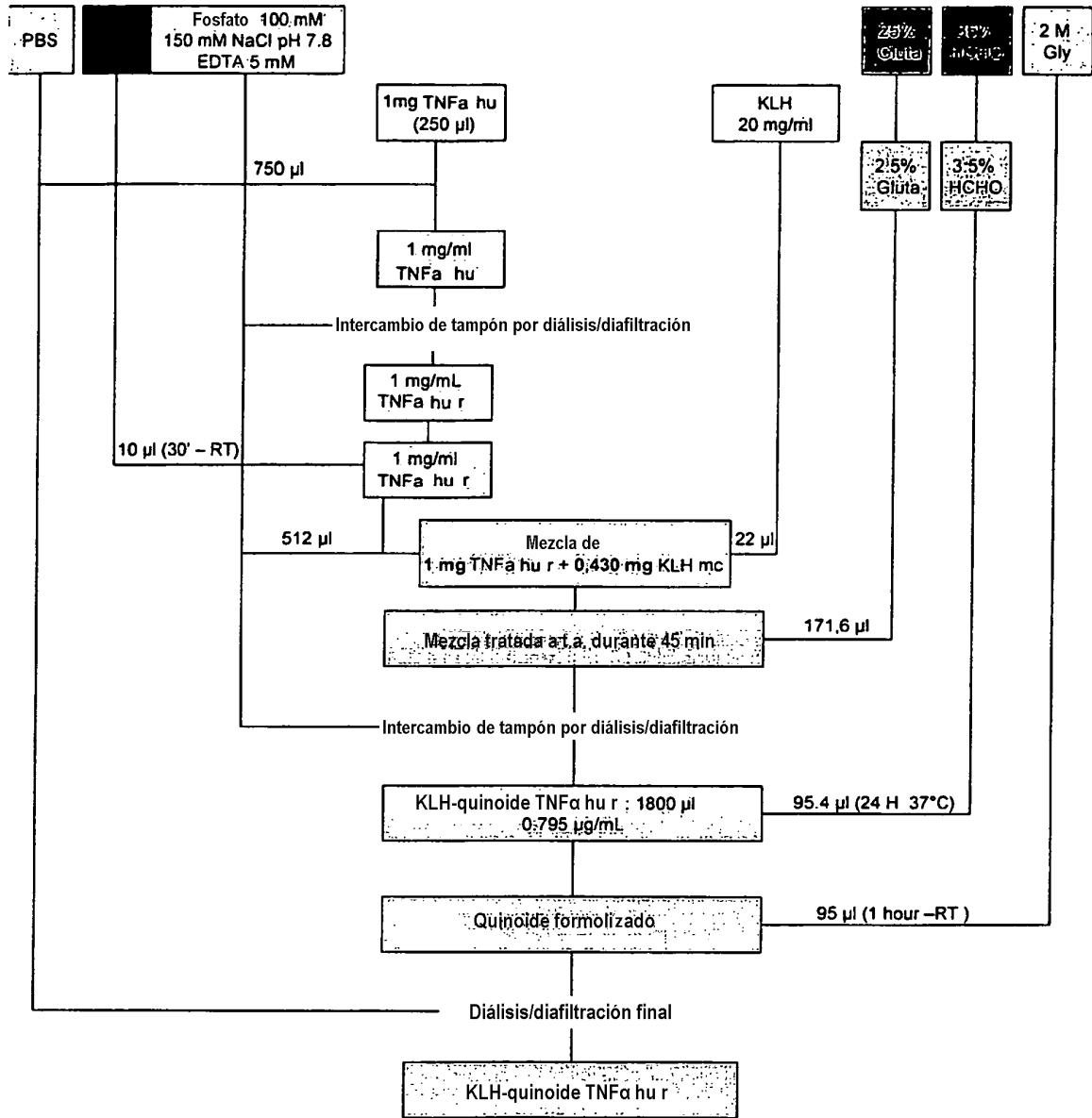
a) preparar un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  realizando el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23; y

b) combinar dicho producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  preparado en la etapa a) con uno o más inmunoadyuvantes.

25. Producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  preparado por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

26. Composición inmunógena que comprende un producto inmunógeno anti-FNT $\alpha$  preparado por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

27. Composición de vacuna que comprende un producto inmunógeno anti-TNF $\alpha$  preparado por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en combinación con uno o más inmunoadyuvantes.



Distribuido en alícuotas y almacenado a -20°C

Figura 1

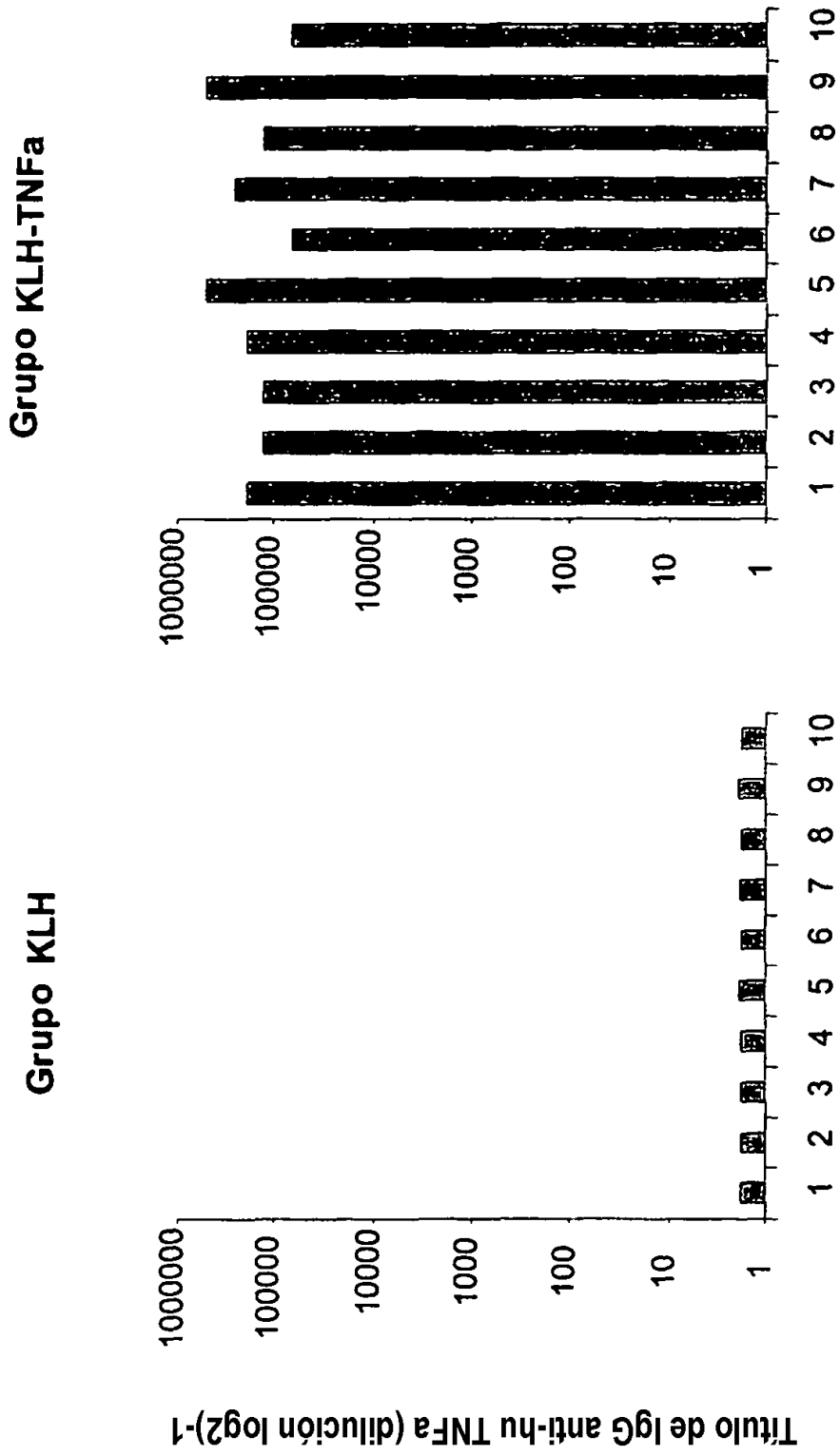


Figura 2

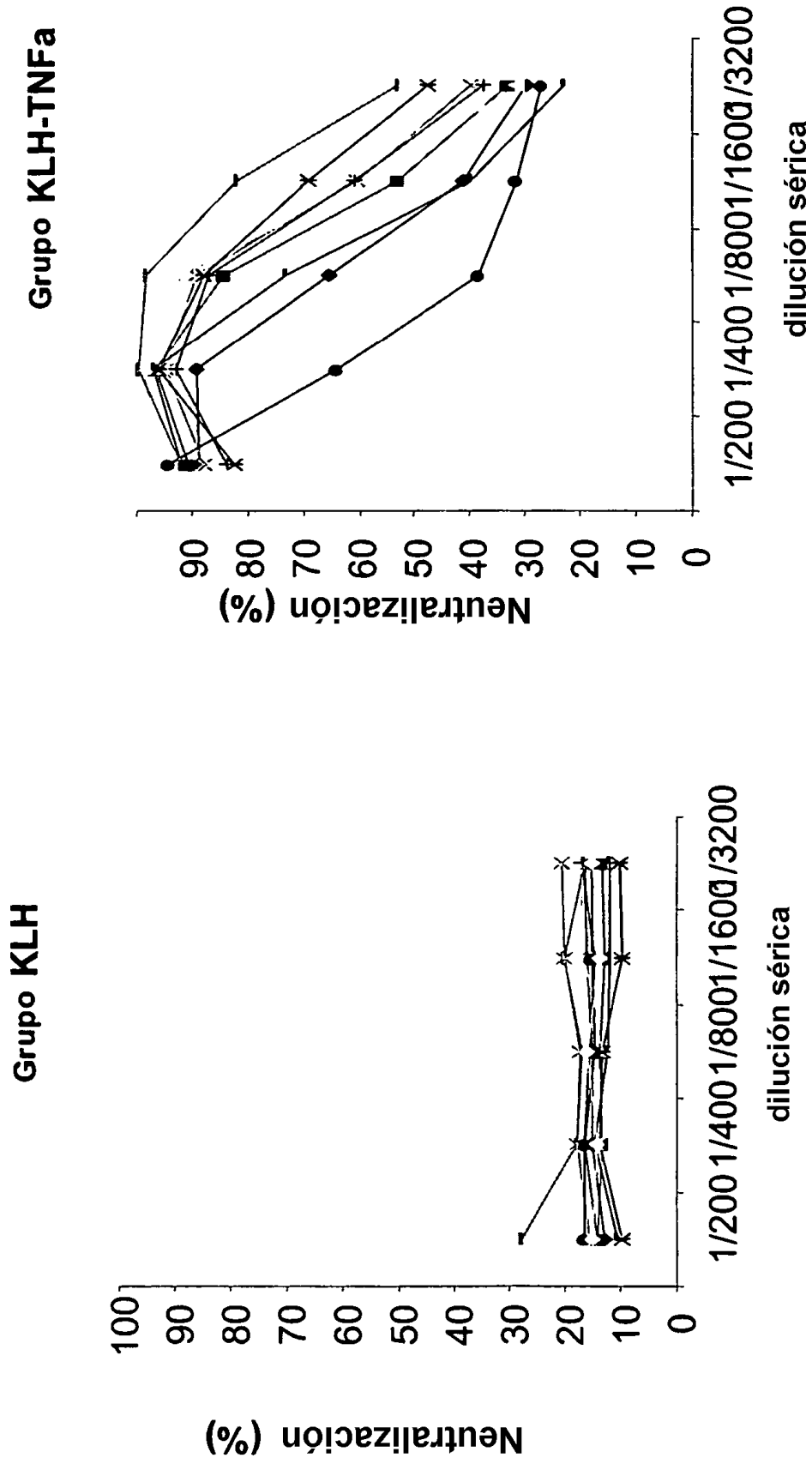


Figura 3



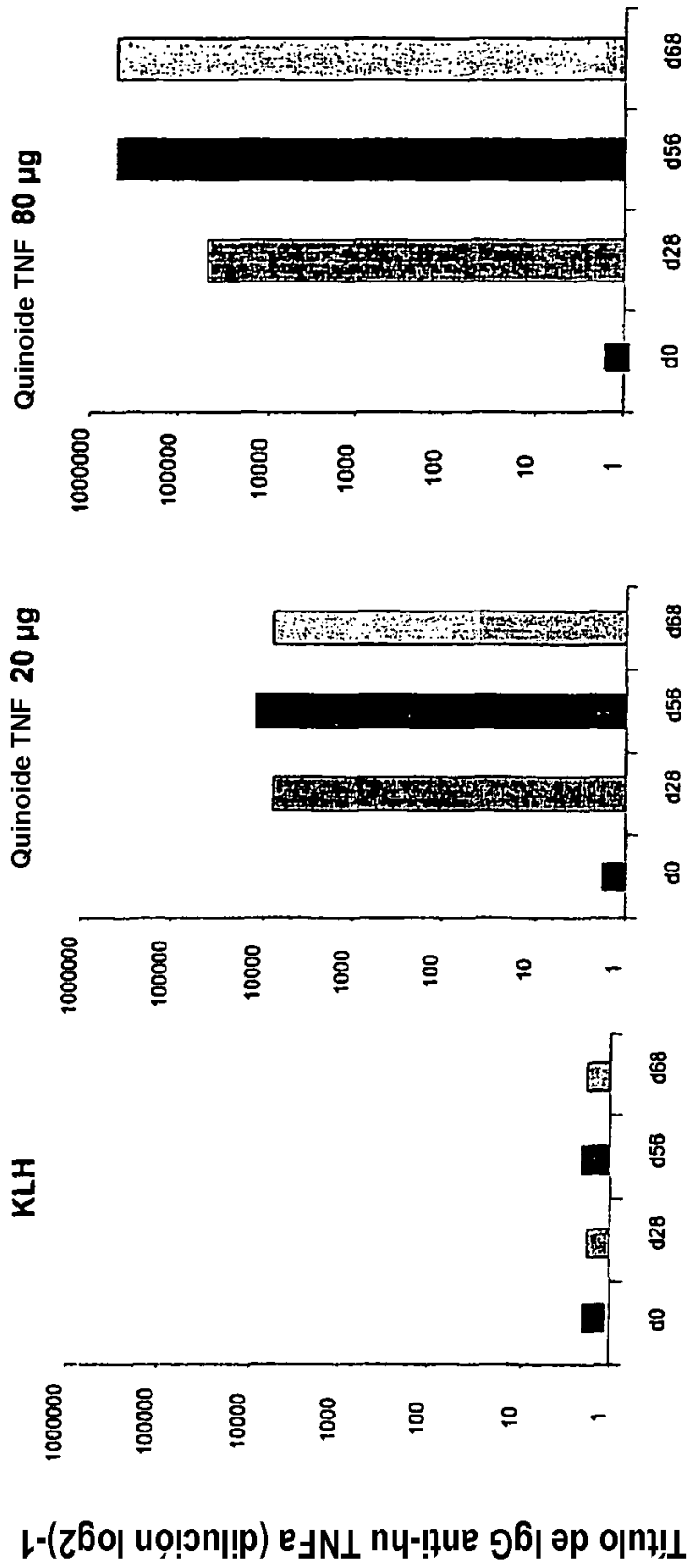
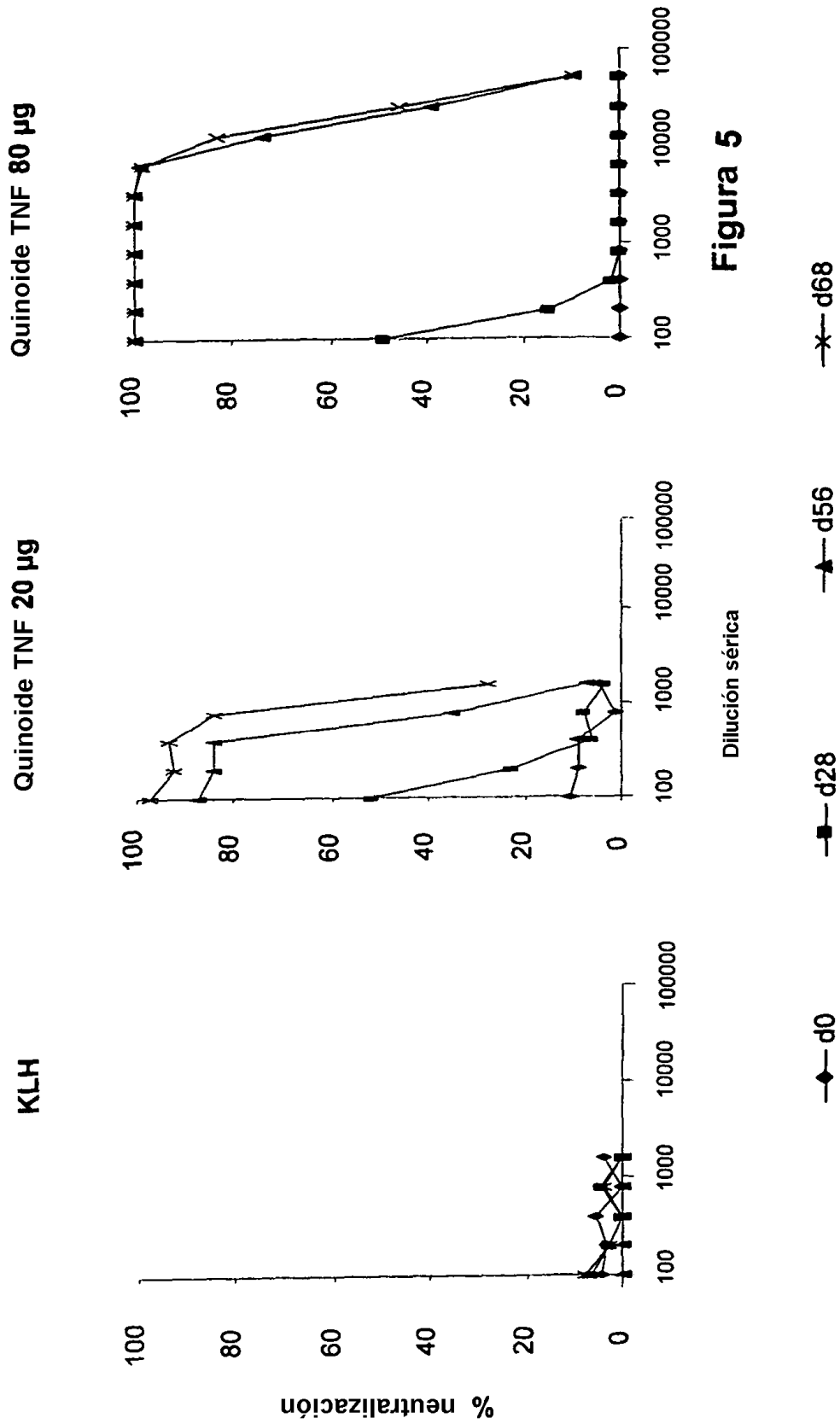
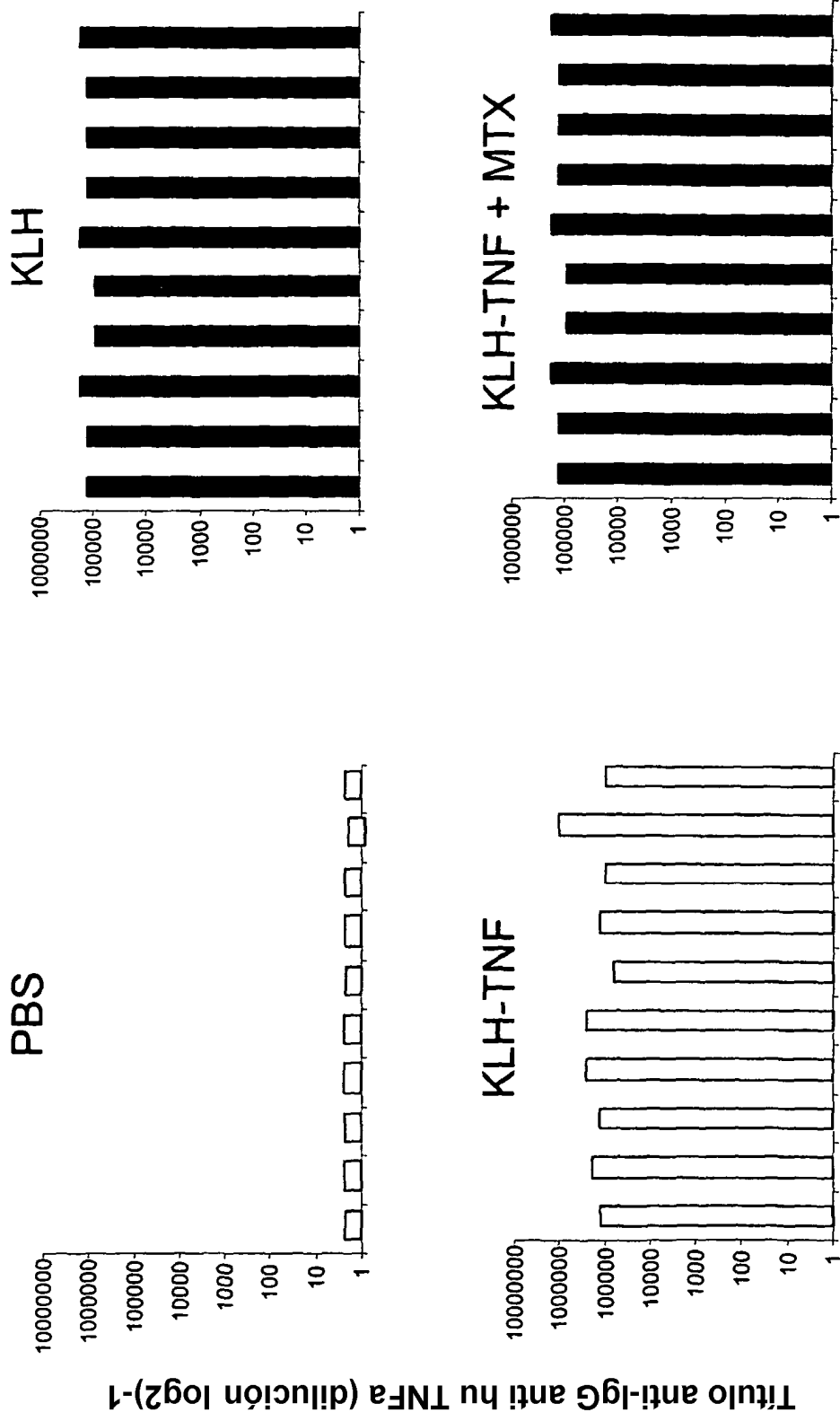


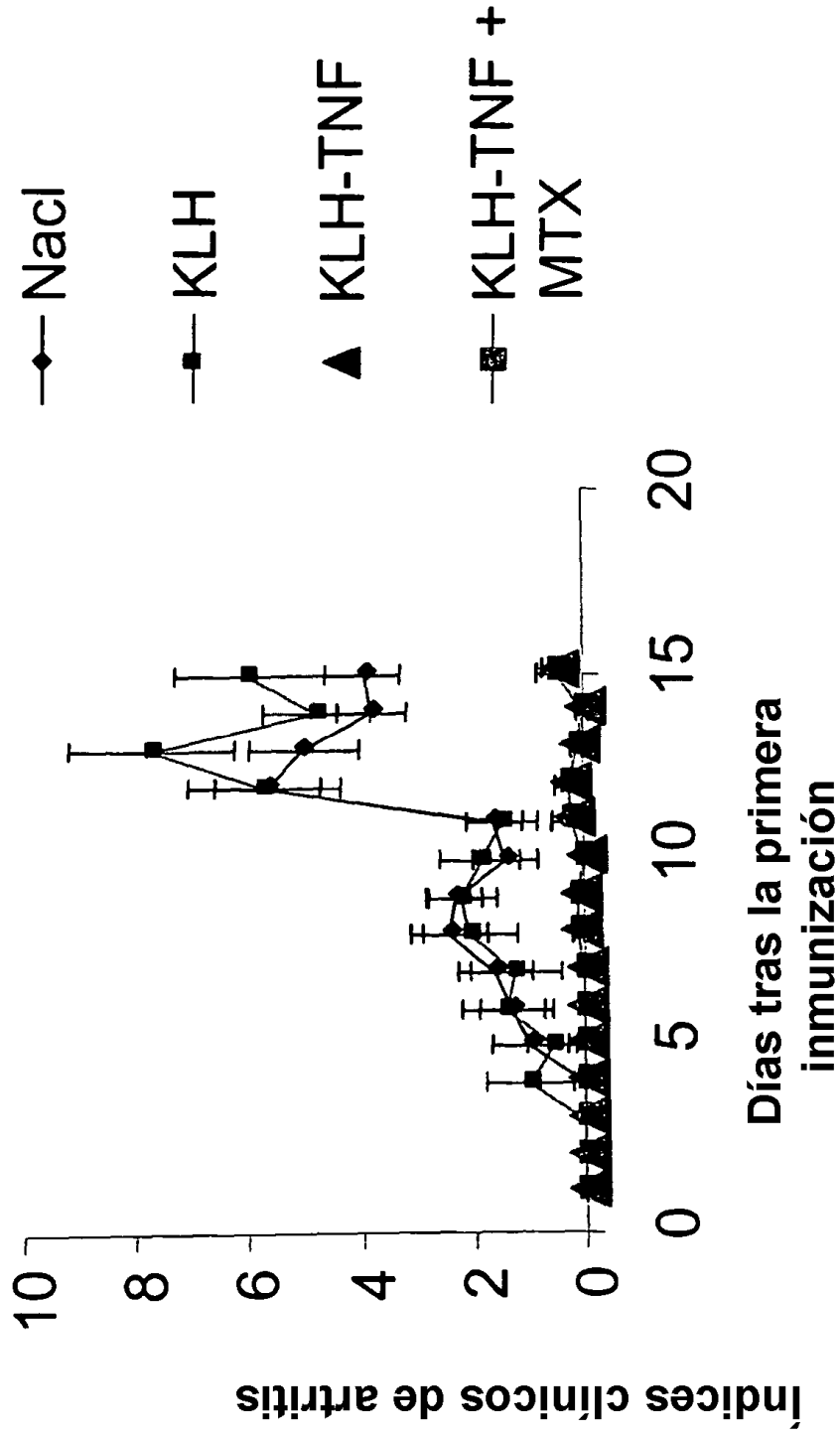
Figura 4





ratones

**Figura 6**



\*  $p < 0.001$  vs NaCl y vs KLH (prueba ANOVA)

Figura 7

Figura 8

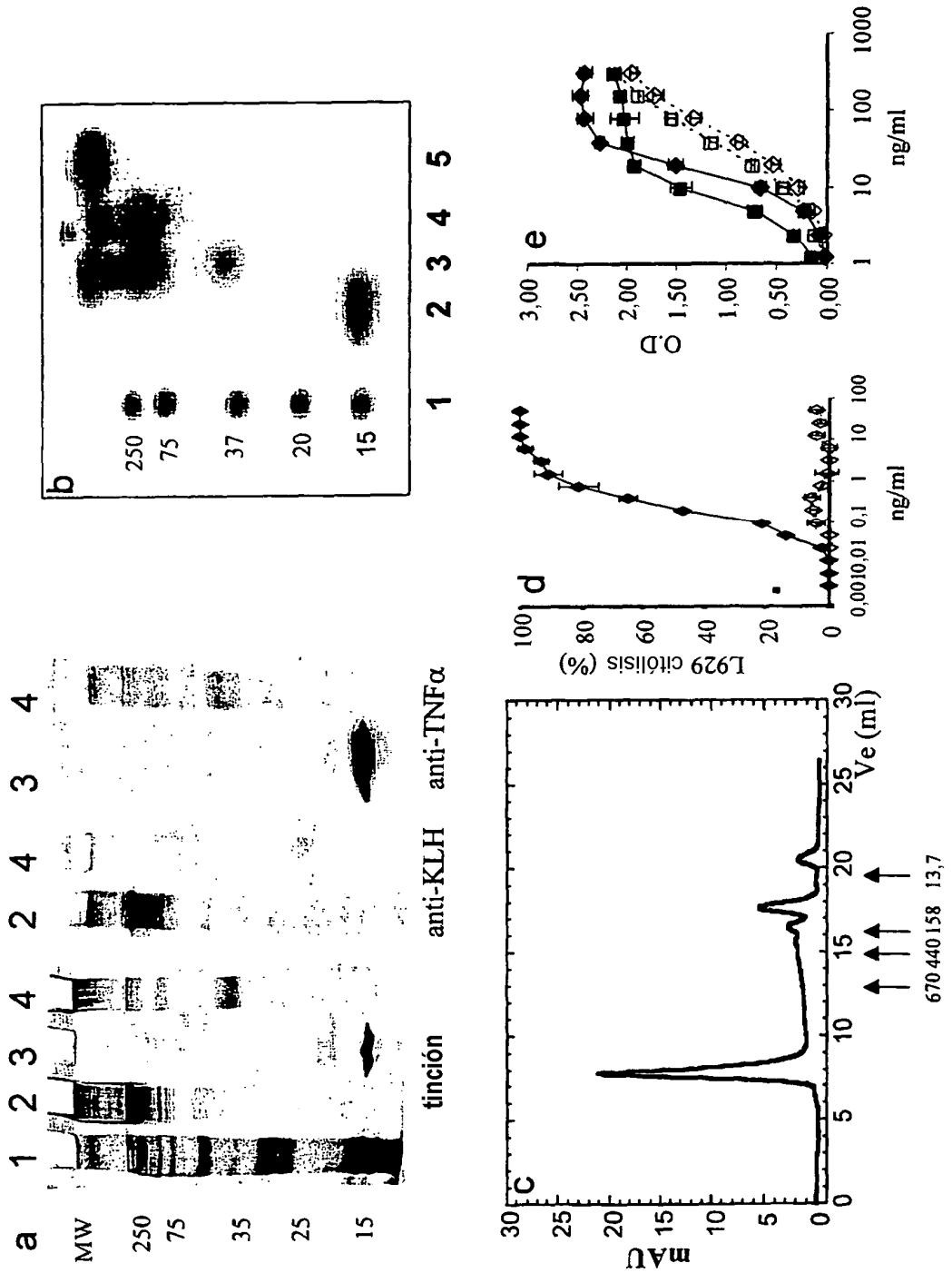


Figura 9

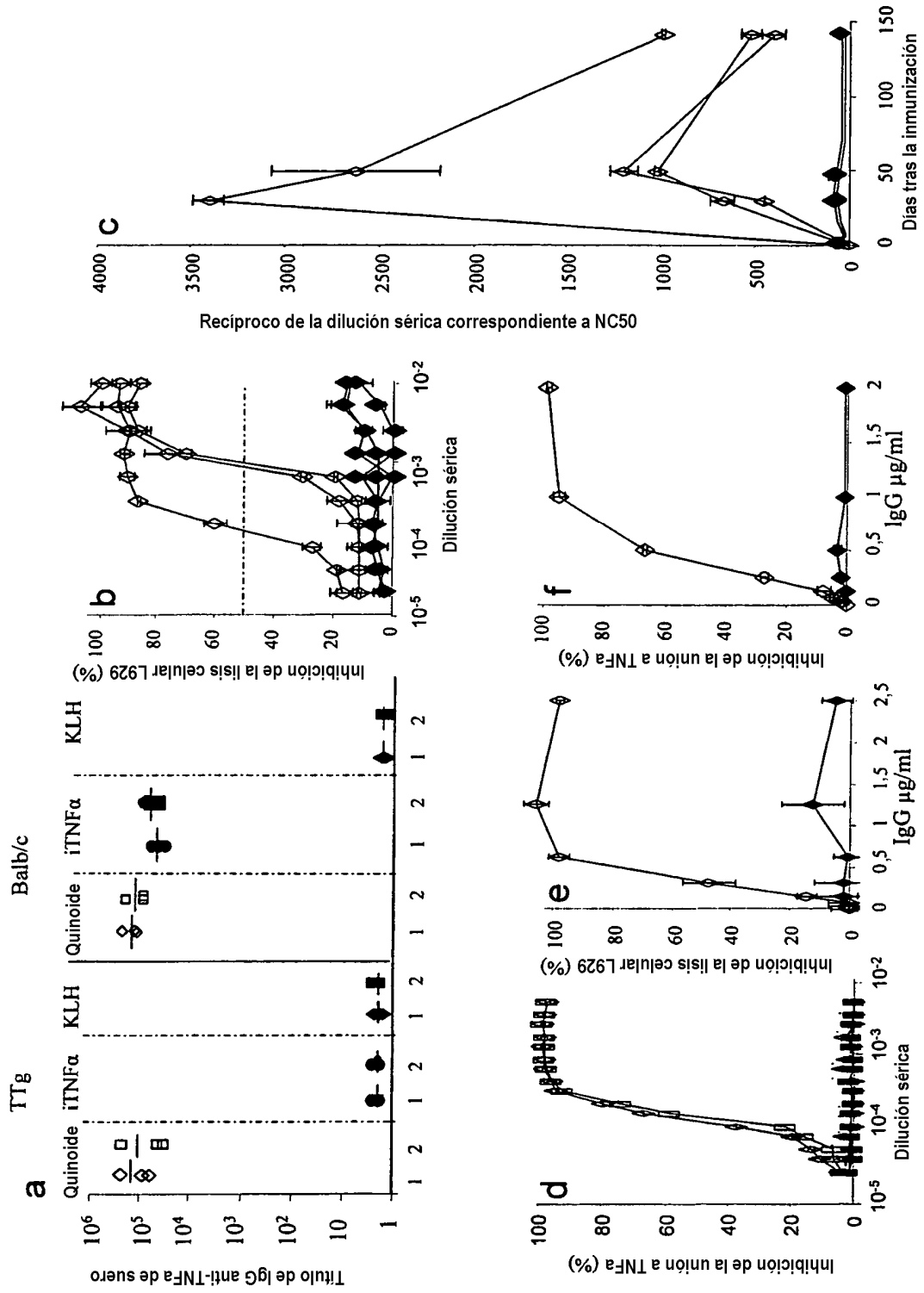


Figura 10.

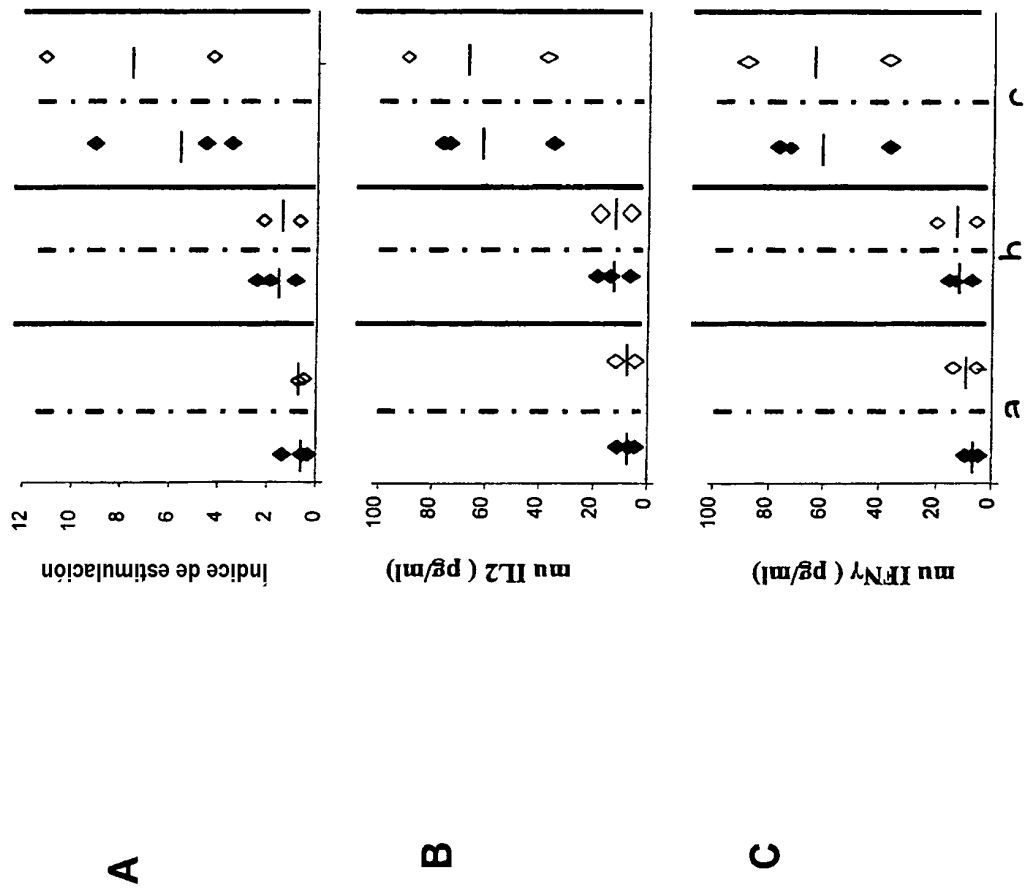


Figura 11

