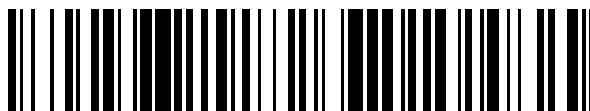


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 769**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 25/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2005 E 05761917 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1767221**

54 Título: **Preparación y utilización de una vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína**

30 Prioridad:

07.07.2004 MX PA04006617

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2013

73 Titular/es:

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN
DE LA FUENTE MUÑIZ (100.0%)
Calzada México-Xochimilco No. 101, Col. San
Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan
C.P. 14370 México, D.F., MX**

72 Inventor/es:

**ANTÓN PALMA, BENITO y
LEFF GELMAN, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 435 769 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

Preparación y utilización de una vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína

5 La presente invención se llevó a cabo gracias al apoyo y asesoramiento científico del Dr. Gerardo Heinze Martín y del Dr. Ramón de la Fuente Muñiz, El trabajo fue financiado por la Fundación Gonzalo del Río Arronte y por el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (Subvención 2040).

10 **Campo técnico**

Se da a conocer un procedimiento para la preparación y utilización de una vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína, la cual puede provocar una fuerte respuesta inmunitaria humoral contra estas dos drogas opioideas adictivas a través de la inmunización activa en mamíferos incluyendo el ser humano. El procedimiento para la preparación de dicha vacuna bivalente consiste en el diseño, síntesis, purificación, aplicación y validación terapéutica. La formulación estructural de esta vacuna consiste en la síntesis inicial y haptización de un derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato para el toxoide tetánico utilizado como proteína portadora. Esta última etapa química se lleva a cabo utilizando un largo brazo molecular espaciador sintetizado sucesivamente a partir de la condensación covalente del reactivo reticulador homobifuncional, el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y el reactivo reticulador heterobifuncional N-(ε-trifluoroacetilcaproiloxi)-succinimida-éster (TFCS). La respuesta inmunitaria humoral provocada por la inmunización activa con dicha vacuna estaba caracterizada por la presencia de valores altos y constantes de anticuerpos policlonales circulantes, que reconocen y se unen con especificidad equivalente tanto a la morfina como a la heroína en la sangre, evitando de este modo su penetración en la barrera hematoencefálica en el cerebro. La alteración de la farmacocinética de estas dos drogas conduce a una reducción significativa de la fracción no unida "libre" de morfina y heroína en el plasma, mitigando de este modo la entrada de la droga en el cerebro. Por lo tanto, el antagonismo del anticuerpo en la penetración en la barrera encefálica de los opioideos aumenta un mecanismo inmunoprotector que evita los efectos reforzadores de las drogas de estas dos sustancias opioideas actuando en el sistema remunerador mesocorticolímbico, en roedores vacunados activamente con este inmunógeno previamente preparado para autoadministrar estos dos reforzadores farmacológicos. Por lo tanto, la presente exposición, describe el procedimiento para la preparación de una vacuna bivalente contra la adicción a morfina y/o heroína, la cual representa un nuevo inmunoreactivo o composición farmacéutica o formulación terapéutica que puede aplicarse, valorarse y validarse como un nuevo tratamiento inmunofarmacológico antiadictivo contra estas dos drogas opioideas en protocolos de vacunación activa en seres humanos.

35 **Antecedentes de la invención**

La drogadicción con propiedades adictivas reforzadoras representa un problema serio de salud pública en todo el mundo. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América, casi 48 millones de ciudadanos han estado expuestos a drogas ilegales durante un periodo de un año (Neurobiological Adaptations to Psychostimulants and opiates as basis of treatment development. En: New Medications for Drug Abuse, K. Severino, A. Olivito y T. Kosten, 2000). Por lo tanto, este problema de salud presenta efectos graves y progresivos los campos social, económico y médico de los países afectados. Epidemiológicamente, los psicoestimulantes tales como la cocaína y las anfetaminas, y en menor medida, las sustancias opioideas, como la heroína y morfina, representan los fármacos más extendidos que causan la morbilidad adictiva más alta en todo el mundo. En los países en vías de desarrollo como México, los datos epidemiológicos de la última Encuesta Nacional de Adicciones (M. E. Medina-Mora y E. Rojas Guio, Salud Mental, 26(2): 1-11, 2003) notificó un aumento alarmante en el consumo de drogas de dichas sustancias en la parte central del país, así como en las ciudades situadas entre México y la frontera de EE.UU. A nivel clínico, hay varias patologías comórbidas relacionadas con la toxicomanía de sustancias ilegales, que se dividen en diferentes categorías. En primer lugar, el alto índice de mortalidad relacionado con los efectos tóxicos provocados por la sobredosis de dichas sustancias. En segundo lugar, la provocación de efectos teratógenos en el recién nacido, que están asociados con frecuencia a la drogadicción de sustancias ilegales por las madres embarazadas adictas. Por último, la alta incidencia de enfermedades comórbidas de adquirir infecciones víricas, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), detectado con frecuencia en toxicómanos de heroína, así como el aumento de los índices de criminalidad, violencia y delincuencia asociados con el tráfico de drogas y el consumo de drogas de dichas sustancias ilegales. Por lo tanto, a nivel terapéutico, existe una necesidad urgente de reenfoque y establecer estrategias de gobierno directas, programas de salud y nuevas medicaciones para luchar eficazmente contra la drogadicción de sustancias ilegales.

La neurobiología de la drogadicción se inició hace más de tres décadas y la mayoría de las investigaciones se han ocupado de la farmacocinética y la farmacodinámica de las drogas. A nivel farmacocinético, la drogadicción con sustancias ilegales tales como la cocaína, la morfina y la heroína, presenta potentes propiedades reforzadoras de las drogas y perfiles farmacocinéticos específicos, que en última instancia conducen a sus altos efectos de drogadicción en el cerebro. La morfina es un alcaloide con una estructura química fenantrénica (véase el ejemplo 1) obtenido a partir del extracto lechoso (goma de opio) de la *Papaver somniferum*, y representa el principal compuesto extraído (≥ 10%) junto con otros compuestos estructuralmente relacionados, tales como la codeína, tebaína y papaverina (C. P. O'Brien, Drug Abuse, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Págs. 621-642, 10ª ed. J. G. Hardman y L. E. Limbird, eds. McGraw Hill, Nueva York, 2001). La morfina posee un grupo hidroxilo en tercera

posición y un grupo hidroxilo alcohólico en sexta posición colocado dentro de la estructura del anillo fenólico. Por el contrario, la heroína, un derivado semisintético de la morfina, tiene dos grupos acetilo condensados en las posiciones mencionadas anteriormente dentro de la estructura de anillo fenantrénico opioideo (C. P. O'Brien, Drug Abuse, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Págs. 621-642, 10ª ed. J. G. Hardman y L. E. Limbird eds. McGraw Hill, Nueva York, 2001). Tanto la morfina como la heroína se absorben en el tubo digestivo y en el aparato respiratorio, incluyendo la mucosa bucal, así como en los espacios subcutáneo, intramuscular, intravascular e intratecal. Estos dos compuestos opioideos presentan un perfil farmacocinético similar sorprendente, en base a su elevada capacidad de penetración en la barrera hematoencefálica, sobre todo debido a sus elevadas propiedades lipófilas (C. P. O'Brien, Drug Abuse, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Págs. 621-642, 10ª ed. J. G. Hardman y L. E. Limbird, eds. McGraw Hill, Nueva York, 2001). De hecho, la heroína es relativamente más lipófila que la morfina y por lo tanto penetra más rápido la barrera hematoencefálica que la morfina. La principal ruta catabólica de la morfina se produce principalmente en el hígado y depende de la conjugación enzimática dependiente con ácido glucurónico temperatura tanto en los tres como en los seis grupos hidroxilo situados en la estructura de anillo fenantrénico, produciendo metabolitos endógenos, tales como morfina 3-, morfina 6- y en menor medida, morfina 3-6-glucurónido. Estos compuestos intermedios catabólicos, representan las formas estructurales secretora y/o excretora de la morfina en la orina. Por otra parte, el morfina-6-glucurónido se ha demostrado que presenta potentes efectos analgésicos y psicotrópicos, reforzadores de las drogas en el cerebro. Por lo tanto, los metabolitos de la morfina generados desde el hígado en el torrente sanguíneo, penetran rápidamente la barrera hematoencefálica y activan el subtipo de receptor opioideo mu en las vías de recompensa del cerebro que participan como mediadores de los efectos reforzadores de la droga (L. M. Kamendulis *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 279:713-717, 1996; C. W. Hutto Jr. y W. Crowder, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (1):133-140, 1997, A. J. Halliday *et al.*, *Life Sci.* 65(2):225-236, 1999 y D. E. Selley *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 62:447-455, 2001). De hecho, estudios farmacocinéticos recientes (véase el estudio y las referencias incluidas en J. Halliday *et al.*, *Life Sci.* 65 (2) 225-236, 1999) apoyan la idea de que en las acciones analgésicas y/o adictivas de la morfina en el SNC no interviene directa y predominantemente como mediador la propia morfina, sino que en gran medida son ejercidas por sus metabolitos activos glucuronados tales como el morfina-6-glucurónido. Hasta ahora, varios estudios (L. M. Kamendulis *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 279:713-717, 1996 y A. J. Halliday *et al.*, *Life Sci.* 65 (2) 225-236, 1999) han presentado similares mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la heroína. Por lo tanto, una vez que se administra la heroína, una gran fracción del fármaco se cataboliza rápidamente en el plasma y/o el hígado en 6-monoacetil-morfina, y posteriormente se cataboliza en morfina y finalmente se convierte en morfina-6-glucurónido, antes de alcanzar sus objetivos neuronales (por ejemplo, receptor opioideo mu) (R. E. Aderjan y G. Skopp, *Ther. Drug Monit.*, 20 (5): 561-9, 1998). Estos descubrimientos apoyan el concepto actual de que el agonismo farmacológico de la heroína y sus metabolitos endógenos (por ejemplo, 6-monoacetil-morfina y morfina) en el receptor opioideo mu, incluidos los metabolitos activos finales de biotransformación (por ejemplo, morfina-6-glucurónido) representa el mecanismo farmacodinámico por el cual estas sustancias mejoran sus acciones de refuerzo adictivas en el cerebro (A. J. Halliday *et al.*, *Life Sci.* 65 (2): 225-236, 1999, D. E. Selley *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 62:447-455, 2001 y C. P. O'Brien, Drug Abuse, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. págs. 621-642, 10ª ed. J. G. Hardman y L. E. Limbird, eds. McGraw Hill, Nueva York, 2001).

Varios estudios farmacodinámicos (véanse trabajos examinados en E. J. Nestler, *Nat. Neuroci.* 5:1076-1079, 2002 y por ejemplo N. Deslandes *et al.*, *J. Pharmacy and Pharmacol.* 54:885-895, 2002) han demostrado que la drogadicción tanto con heroína como con morfina conduce al desarrollo y creación de cambios específicos a largo plazo a nivel celular y molecular que en última instancia produce la expresión de neuroadaptaciones biológicas a la adicción a los opioideos. Por otra parte, estos cambios neuronales producen importantes cambios electrofisiológicos, neuroquímicos y genómicos, que se crean y consolidan progresivamente en un período a largo plazo (por ejemplo, años) en el cerebro durante la adicción a las drogas. Por consiguiente, los cambios de comportamiento que ocurren durante la adicción a los opioideos a estas drogas en cada individuo, siguen un curso de tiempo de aumento de la complejidad y la intensidad con respecto a la sintomatología de la drogadicción. Por ejemplo, la administración repetida de heroína por un adicto, produce un aumento de comportamientos compulsivos estereotipados que conducen a comportamientos incontrolados por consumo de drogas, asociados con ritos de administración estereotipados, inicialmente acompañados por la tolerancia farmacológica y, posteriormente, por los signos físicos y síntomas de abstinencia de drogas después de supresión aguda del fármaco opioideo (K. Severino *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 909: 51-87, 2000). Por lo tanto, el comportamiento por consumo de heroína se convierte en la mayor prioridad y necesidad en los individuos adictos, lo que conduce a la vuelta al consumo compulsivo de drogas y a conductas de búsqueda de drogas normalmente observados durante la retirada o la abstinencia de drogas. Los cambios neuroadaptativos que ocurren durante la adicción a los opioideos son producidos principalmente por las acciones farmacológicas mostradas por la exposición repetida de la droga en un conglomerado de neuronas localizadas en diferentes zonas del cerebro (K. Severino *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 909: 51-87, 2000). Estas zonas cerebrales incluyen el locus cerúleo, el hipocampo, el hipotálamo lateral, el área tegmental ventral, complejo amigdalino, núcleo accumbens y la corteza prefrontal, que está estructuralmente formada por el sustrato neuroanatómico y vías nerviosas donde las sustancias opioideas y otras drogas ilegales (por ejemplo, la cocaína) ejercen principalmente sus actividades gratificantes de la droga y de refuerzo de la droga (K. Severino *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 909: 51-87, 2000). En este sentido, la administración crónica tanto de morfina como de heroína provoca el desarrollo de una serie de respuestas adaptativas homeostáticas celulares y moleculares en las neuronas dentro de las estructuras del cerebro mencionadas anteriormente influenciadas por el fármaco. Dichas respuestas adaptativas implican varias alteraciones electrofisiológicas, bioquímicas y genómicas observadas durante la adicción

de drogas, que en conjunto, se producen para mantener y restablecer la homeostasis funcional preexistente de los circuitos neuronales implicados y sus neuronas operantes alterados durante la drogadicción, antes del comportamiento compulsivo de consumo de drogas (K. Severino *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 909: 51-87, 2000). Una vez creadas estas neuroadaptaciones, la suspensión brusca del comportamiento por consumo de drogas mejora el desarrollo de nuevas series de cambios neurobiológicos y adaptaciones celulares en las neuronas influenciados por las drogas, lo que conduce a la base neuropatológica que subyace en el síndrome de abstinencia durante la drogadicción. El síndrome de abstinencia producido tanto por la morfina como por la heroína en los individuos adictos, en comparación con el síndrome de abstinencia provocado por la cocaína y la anfetamina, se caracteriza por alteraciones físicas y psicológicas muy intensas en el individuo adicto (H. Ghodse, *Drugs of abuse and dependence*. En: *Drugs and Addictive Behavior, a guide to treatment*, Blackwell Science Ltd, ed, Oxford, Reino Unido, págs. 72-119, 1995; GF Koob, *Ann N. Y. Acad. Sci. Vol.* 909:185 2000 y K. Severino *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 909: 51-87, 2000). Clínicamente, el síndrome de abstinencia se caracteriza por cuatro etapas diferentes desarrolladas en un periodo de tiempo progresivo o gradual. Durante las primeras 1 a 7 horas, el adicto bajo abstinencia desarrolla manifestaciones de comportamiento caracterizadas por un deseo compulsivo y ansiedad extrema por consumo de drogas. Durante una segunda fase (después de 8 a 15 horas), se añaden alteraciones físicas, como lagrimeo intenso, sudoración extrema, rinorrea y letargo a la sintomatología inicial de la droga. Más adelante, después de 16 a 24 horas tras la continuación con la abstinencia de drogas, signos físicos tales como midriasis, piloerección, calambres musculares y cambios en la temperatura corporal (por ejemplo, percepción de frío intenso y de calor) además de algias difusas, anorexia y la irritabilidad pueden aparecer también. Posteriormente, tras la retirada persistente (por ejemplo, 2 a 6 días), otros signos físicos y de comportamiento pueden aparecer que incluyen el insomnio, fiebre, retraso motor, dolor abdominal, vómitos y diarrea, así como aumento de la respiración anormal, incluyendo cambios en la frecuencia del pulso y la presión arterial. Por lo tanto, desde la perspectiva de la sintomatología que ocurre en adicción a las drogas, la duración y la gravedad de la abstinencia de la morfina y la heroína depende de varios factores farmacocinéticos y farmacodinámicos. Por otra parte, se ha comunicado que la gravedad del síndrome de abstinencia de opioides depende de varios aspectos farmacológicos y biológicos, que incluyen la cantidad diaria de consumo de drogas (por ejemplo, dosis inyectada por persona), el período de tiempo de consumo y/o abuso de drogas, además del estado físico y de la personalidad del individuo que afecta a la respuesta al consumo de drogas.

Por lo tanto, dada la complejidad de la historia natural de la patología adictiva de la morfina y/o heroína, pocos tratamientos farmacológicos actualmente disponibles han sido diseñados para modificar los mecanismos farmacodinámicos por los que estas sustancias opioides producen sus acciones reforzadoras de drogas una vez se unen sus sitios receptores específicos a sus neuronas específicas (D. M. Grilly, *Opioids (narcotics) and their antagonists*. En: *Drugs and human behaviour*, 4ª ed. págs. 238-262, Allyn and Bacon, eds. EE.UU., 2002). En este sentido, el tratamiento de desintoxicación aguda de opioides representa el enfoque farmacoterapéutico inicial y el más utilizado actualmente para tratar a los adictos clínicamente crónicos, que se convierte en una prioridad y emergencia médica para aliviar los signos y síntomas físicos del individuo de abstinencia de drogas, que están comúnmente asociados con alteraciones fisiológicas, endocrinológicas y químicas provocadas por la adicción a las drogas. Por ejemplo, los agonistas parciales de los receptores mu opioides tal como la metadona y la buprenorfina, en combinación con las benzodiazepinas y/o neurolépticos sedantes se recetan frecuentemente y se administran para el tratamiento de desintoxicación aguda por opioides. A diferencia de los procedimientos de desintoxicación aguda utilizados para tratar la adicción a los opioides, la terapia de sustitución utilizando sustancias opioides tales como la metadona y/o la buprenorfina, así como antagonistas de los receptores opioides, tales como la naloxona y/o la naltrexona, no son del todo recomendable durante la abstinencia de opioides, porque empeoran la demanda de comportamiento por consumo de drogas de los compuestos opioides originales que provocaban o instalaban el anterior estado adictivo de la droga en el individuo. En circunstancias normales, el tratamiento y el mantenimiento de síndrome de abstinencia de los opioides requiere hospitalización y atención clínica con el apoyo de personal médico especializado, que normalmente resulta ser muy costoso.

Del mismo modo que el síndrome de abstinencia, la desintoxicación completa de la morfina y/o heroína (supresión de comportamiento por consumo de drogas) en individuos adictos es un importante problema de salud que se persigue. En base a la amplia gama de cambios funcionales anormales establecidos después de un período a largo plazo en el cerebro producidos por el abuso crónico a los opioides, es fácil de entender las dificultades para restablecer la función homeostática del cerebro, antes del consumo de drogas, mediante las terapias de desintoxicación disponibles actualmente. Por lo tanto, a pesar de estas limitaciones terapéuticas, un tratamiento de desintoxicación ideal debe estudiarse para satisfacer criterios médicos específicos descritos de la siguiente manera. En primer lugar, debería estar encaminada a bloquear o atenuar la dependencia fisiológica y psicológica de los opioides a fin de restablecer el equilibrio homeostático de los sistemas neuronales crónicamente desregulados por sustancias opioideas. En segundo lugar, los tratamientos de desintoxicación deben inhibir los cambios físicos y de comportamiento pertinentes que parecen empeorar durante la abstinencia de drogas producida por intervenciones terapéuticas, dando como resulta con ello una experiencia tolerable y tratamientos de seguridad. Además, se debe proporcionar una suspensión completa del comportamiento del individuo por consumo de drogas, reorientando de este modo los individuos adictos a otros tratamientos no farmacológicos alternativos disponibles (por ejemplo, psicoterapia y orientación). Después, una vez se alcanza la terapia completa la desintoxicación de opioideos, el objetivo médico final que debe abordarse es la prevención de recaídas posteriores en el consumo de opioides. Por lo tanto, desde un punto de vista médico general, los retos terapéuticos para paliar la adicción a morfina y/o heroína

son enormes y, en la mayoría de los casos, difíciles de mejorar. Los principales obstáculos enfrentados tanto por los tratamientos farmacológicos como por los no farmacológicos, son la falta de un número adecuado de clínicas u hospitales especializados, los elevados costes económicos de la terapia por lo general facturados al paciente, y, sobre todo, la ausencia de cualquier programa de seguimiento de los pacientes (es decir, años) o la evaluación clínica continua así como la falta de aplicación de la psicoterapia de apoyo a largo plazo para evitar la recaída en las drogas. Además, otro gran problema al que se enfrentan la mayoría de los tratamientos antiadictivos actuales contra el consumo de opioides es la toxicidad del efecto secundario resultante de la dosificación a largo plazo de los agentes farmacológicos individuales o combinados (K. Severino *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 909: 51-87, 2000). Por ejemplo, la metadona y la buprenorfina, dos agonistas parciales de larga duración del receptor opioide mu, representan los fármacos terapéuticos de sustitución más corrientes utilizados hoy en día para atenuar el síndrome de abstinencia de opioides o para prolongar la abstinencia de opioides (M. J. Kreek, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 909: 186-216, 2000). Además, los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 tales como la clonidina, guanfacina y/o lofexidina representan otra serie de compuestos utilizados muy frecuentemente en las terapias de desintoxicación para mejorar los signos y síntomas de abstinencia originados por la supresión brusca de las drogas opioideas (M. J. Kreek, *Ann. NY Acad. Sci.*, 909:186-216, 2000). Sin embargo, además de su utilización ampliamente en terapias de desintoxicación a largo plazo y/o en el mantenimiento del tratamiento de la abstinencia, estas drogas han demostrado provocar varios efectos secundarios tóxicos. Por ejemplo, la metadona, la buprenorfina y la pentazocina se han comunicado que producen trastornos del sueño, ansiedad y deterioro cognitivo y emocional grave. Además, los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 se ha comunicado que producen sedación, hipotensión, ansiedad extrema y astenia después de la administración a largo plazo. Además, los pacientes que reciben opioideos de sustitución con metadona, pueden no sorprendentemente, mostrar la aparición de signos y síntomas de la dependencia a opioideos, debido que este agonista parcial de los receptores opioideos mu produce los mismos cambios neuroquímicos, celulares y neuroadaptativos moleculares en el cerebro, que los descritos tanto para la morfina como para la heroína durante la adicción a los opioides (M. J. Kreek, *Ann. NY Acad. Sci.*, 909:186-216, 2000). Actualmente otros fármacos utilizados disponibles para prolongar la abstinencia y evitar recaídas contra la adicción a morfina y/o heroína en pacientes desintoxicados comprenden los antagonistas de los receptores mu opioides, naloxona y naltrexona. Los efectos secundarios tóxicos a menudo observados durante la administración a largo plazo de estos compuestos son en su mayoría debido al bloqueo de los sistemas de transmisión de los opioides endógenos en el cerebro, que conduce al deterioro de las funciones cerebrales cognitivas y emocionales, entre otras muchas actividades fisiológicas (M. J. Kreek, *Ann. NY Acad. Sci.* 909:186-216, 2000).

Hasta ahora, una de las principales conclusiones extraídas de las terapias farmacológicas descritas anteriormente utilizadas actualmente para abordar la desintoxicación contra el abuso de opioides incluyendo los tratamientos de mantenimiento a largo plazo para la abstinencia de drogas y la prevención de la recaída contra la adicción a morfina/heroína, es que ninguno de estos tratamientos farmacológicos ha demostrado una eficacia óptima. Esta conclusión se basa en el hecho de que estos fármacos producen importantes efectos secundarios tóxicos en los pacientes que recibieron mantenimiento a largo plazo de la abstinencia y/o de prevención de recaídas (T. Kosten y D. Biegel, *Expert Rev. Vaccines*, 1(3): 89-97, 2002). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar y validar nuevas estrategias terapéuticas antiadictivas, basadas en la síntesis, aplicación y validación de nuevas formulaciones muy eficaces de drogas, que muestren mínima toxicidad y sin efectos secundarios detectados, cuando se pretende que se utilicen en la tratamientos a largo plazo para la desintoxicación aguda y de mantenimiento a largo plazo de la abstinencia de morfina y/o heroína.

En este sentido, diferentes grupos han diseñado, aplicado y validado estrategias terapéuticas alternativas en modelos animales experimentales, que comparten un mecanismo farmacocinético común. Por lo tanto, a la inversa de la farmacología antiadictiva clásica, este último mecanismo se basa en alterar la farmacocinética del fármaco al disminuir significativamente o atenuar la penetración en la barrera hematoencefálica del fármaco no unido "libre" en el plasma, que en última instancia representa la fracción de fármaco en plasma que penetra el cerebro causando los altos efectos de refuerzo y recompensa en el individuo adicto. Todos estos planteamientos experimentales se han centrado en disminuir significativamente o evitar la penetración de barrera hematoencefálica de las drogas, mejorando la unión de la fracción "libre" no unida de fármaco en el plasma por anticuerpos específicos, que reconocen y se unen con gran especificidad y avidez a estos fármacos en la sangre. Como inmunoglobulinas (anticuerpos) normalmente no penetran la barrera hematoencefálica, la fracción en el plasma de "fármaco libre-no unido", que es el grupo de fármaco disponible que penetra la barrera hematoencefálica, interactúa con inmunoglobulinas creando complejos fármaco-anticuerpo, que en última instancia disminuye significativamente esta fracción de fármaco libre no unido en el plasma. Este cambio en la farmacocinética del fármaco en el plasma, conduce a cambios alterados en la farmacodinámica del fármaco en el cerebro, atenuando de este modo o suprimiendo la actividad de drogas adictivas en sus neuronas específicas dirigidas. Estos últimos cambios farmacodinámicos en última instancia conducen a atenuar tanto el desarrollo de las actividades de refuerzo como los efectos placenteros gratificantes provocados por las drogas en el cerebro. La principal propiedad farmacocinética compartida por la mayoría de las drogas, es la alta actividad de penetración hematoencefálica, que representa el mecanismo básico y crucial, por el cual la mayor parte de las drogas potentes produjo sus acciones de refuerzo muy intensas en el cerebro, lo que conduce a la presentación de comportamientos continuos de consumo de drogas y de búsqueda de drogas por individuos tras la exposición a estos compuestos químicos. En este sentido, la generación de anticuerpos séricos específicos contra las drogas representa un enfoque terapéutico alternativo para mitigar o evitar la penetración de barrera hematoencefálica de las drogas para alcanzar sus objetivos neuronales. Se ha

demostrado que este enfoque del antagonismo del anticuerpo que impide la penetración del fármaco en el cerebro aumenta un efecto inmunoprotector contra los comportamientos de consumo de drogas y de búsqueda de drogas, como se ha demostrado para la cocaína, la nicotina, PCP y anfetaminas en roedores (véase un informe de los trabajos y las referencias examinados en la presente memoria en T. Kosten y D. Biegel, *Expert Rev. Vaccines*, 1 (3): 89-97, 2002 y K. Kantak, *Drugs*, 63 (4): 342-252, 2003). En cuanto a la cocaína, varios grupos de investigación fueron capaces de desarrollar y aplicar diferentes estrategias experimentales basadas en el diseño, síntesis, aplicación y validación de varios preparados inmunógenos de proteínas transportadoras con cocaína haptenizada con enlace covalente (Kantak *et al.*, *Psychopharmacology* 148:251-262, 2000; Fox, B. S. *et al.*, *Nat. Medicine*, 2:1129-1132, 1996; Sparenborg *et al.*, *Therapeutics* 293 (3): 952-961, 2000; Carrera *et al.*, *Nature*, 378:727-730, 1995, Carrera, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97 (11) 6202 a 6206, 2000). Se han sido utilizado algunas proteínas de alto peso molecular, tales como BSA y KLH como portadores para cocaína con enlace covalente utilizando procedimientos de acoplamiento covalente químico convencionales. De esta manera, siguiendo los protocolos de inmunización activa en roedores, algunos de estos inmunógenos han demostrado capacidades para generar respuestas de valores de anticuerpos bajos a moderados en contra de esta droga en animales vacunados activamente. Por otra parte, otros enfoques experimentales que confieren efectos inmunoprotectores contra la adicción a la cocaína se han explorado mejorando la generación de anticuerpos monoclonales convencionales y/o catalíticos administrados durante los protocolos de inmunización pasiva contra este fármaco psicoactivo en roedores (Metz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10176-10180, 1998; Fox *et al.*, *Nat. Med.* 2:1129-1132, 1996 y Landry *et al.*, *Science*, 239:1899-1901, 1993). Los efectos inmunoprotectores contra la adicción a la cocaína que utilizan estas estrategias experimentales inmunológicas se han estudiado mediante la detección de la supresión de los comportamientos de refuerzo con drogas en roedores en los modelos farmacológicos y operante-conductual combinados. Estas estrategias experimentales comparten un mecanismo antiadictivo común, que se basa en la reducción significativa y/o la inhibición completa de la penetración hematoencefálica de la fracción no unida "libre" de la cocaína en el plasma. Por lo tanto, en animales hiperinmunes vacunados activamente, la fracción no unida "libre" de fármaco en el plasma se reduce significativamente, una vez que los anticuerpos séricos específicos en la sangre se unen a la droga psicoactiva (Kantak *et al.*, *Psychopharmacology*, 148:251-262, 2000; Carrera *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 (11) :6202-6206; Carrera *et al.*, *Nature*, 378:727-730, 1995). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales generados contra la cocaína, pueden unir la fracción no unida "libre" de cocaína una vez se ha transferido pasivamente a la sangre (Metz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10176-10180, 1998; Fox *et al.*, *Nat. Med.* 2:1129-1132, 1996, Benowitz, *Pharmacol. Toxicol.* 72:3-12, 1993). En ambos casos, el mecanismo de neutralización inmunológica común, que favorece cambios alterados en la farmacocinética de la cocaína, conduce a la disminución significativa o a la inhibición completa de la entrada de fármaco en el cerebro, con lo que disminuye o se atenúa la focalización de la cocaína al transportador de absorción de dopamina de la membrana neuronal específica. Este último mecanismo en el que intervienen anticuerpos como mediadores provocando cambios alterados en la farmacodinámica de la cocaína en el cerebro, daría lugar a cambios en el nivel sináptico de neurotransmisores amínicos, suprimiendo el aumento provocado dependiente en el tono catecolaminérgico central, que normalmente se observa después de la entrada de la cocaína en el cerebro en individuos adictivos. El escenario de comportamiento final que resulta de estos cambios alterados en la farmacocinética de cocaína y episodios neuroquímicos es la falta de efectos de recompensa intensificados provocados por este potente fármaco de refuerzo en el cerebro de los mamíferos. Por lo tanto, una vez se ha neutralizado la cocaína para producir sus efectos de refuerzo y recompensa en animales hiperinmunes, las propiedades reforzadoras de este fármaco se perderán tras una posterior exposición al fármaco, como se demuestra mediante la supresión de los comportamientos búsqueda de drogas y de consumo de drogas en dichos animales vacunados hiperinmunes (roedores) observados con la utilización de algunos conjugados inmunógenos de cocaína.

En resumen, la mayoría de los estudios preclínicos antes mencionados han demostrado la viabilidad de utilizar enfoque de antagonismo basado en anticuerpos para mitigar el consumo de drogas y los comportamientos de búsqueda de drogas en los roedores. Sin embargo, el tipo de las proteínas portadoras (por ejemplo, BSA y KLH) utilizado en la preparación de los conjugados inmunógenos (vacunas) utilizados en estos estudios impiden su utilización potencial en formulaciones de vacunas para su utilización en protocolos de inmunización humana (Carrera *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; Carrera *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; Carrera *et al.*, *Nature*, 378:727-730, 1995; Kantak *et al.*, *Psychopharmacology*, 148:251-262, 2000; Ettinger *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58:215-220, 1997 y Fox, *Drug and Alcohol Depend.* 48:153-158, 1997). Además, la síntesis de anticuerpos catalíticos convencionales y/o anticuerpos monoclonales contra la cocaína catalíticos de ratón utilizados como inmunoterapia pasiva potencial para adición en animales de experimentación (roedores), tiene la limitación principal en conferir inmunoprotección en un periodo corto plazo cuando se administran pasivamente. Esto es debido en su mayor parte a la rápida depuración metabólica de estas inmunoglobulinas murinas del suero de otros animales distintos de ratones inmunizados pasivamente (Goldsby *et al.*, *Vaccines*, en: Kuby Immunology, 4ª ed. Freeman and Co. Nueva Cork, NY, págs. 449-466, 2000). Por otra parte, la utilización potencial de los anticuerpos monoclonales contra la cocaína murinos disponibles como agentes terapéuticos inmunológicos contra adicción a la cocaína en los seres humanos, requiere la utilización de técnicas de ADN recombinante, con el fin de "humanizar" el segmento Fc de inmunoglobulinas murinas.

Por último, la aplicación potencial de este antagonismo de anticuerpos contra la adicción a la cocaína en el ser humano es un tema de actualidad en experimentación como método terapéutico. Esta estrategia inmunofarmacológica se esbozó inicialmente a través de la síntesis de una formulación de vacuna contra la cocaína,

estructuralmente diseñada para uso humano, donde la cocaína estaba conjugada por enlace covalente con la subunidad β recombinante de la toxina del cólera (utilizada como proteína transportadora). A nivel preclínico, este conjugado presentó eficacias moderadas en la activación de respuestas de anticuerpos en ratas vacunadas activamente lo que confirió efectos inmunoprotectores para evitar la recaída al comportamiento de consumo de cocaína en este animal (Kantak *et al.*, *Psychopharmacology*, 148:251-262, 2000). Además, la vacunación activa con este inmunógeno en voluntarios humanos, utilizada para poner a prueba la seguridad y la inmunogenicidad de esta formulación de la vacuna, por desgracia, mostró pocos efectos terapéuticos prometedores, en este único estudio clínico de fase I (T. Kosten *et al.*, *Vaccine* 2559:1-9, 2001), debido al hecho de que esta formulación de la vacuna presentaba poca capacidad inmunógena, produciendo respuestas de valor bajo de anticuerpos [por ejemplo, intervalo de concentración baja (μg) de la inmunoglobulina específica/ml de suero] en la mayoría de los individuos vacunados. Además de las limitaciones experimentales mencionadas, las nuevas vacunas contra la cocaína desarrolladas por diferentes grupos de investigación, actualmente está siendo objeto de estudio, la utilización de diferentes proteínas portadoras, a fin de generar una mejor inmunogenicidad contra este fármaco psicoactivo, en estudios tanto de fase preclínica como de fase I clínica. Una vez que las propiedades inmunógenas de estas formulaciones de vacunas se validan en seres humanos en estudios de fase I clínica, puede llegar a estar disponible para una evaluación posterior en estudios clínicos de fase II evaluando las capacidades inmunoprotectoras de estas formulaciones de vacunas contra la adicción a la cocaína. Por ejemplo, podrían utilizarse estudios clínicos de fase II evaluando la inmunoprotección humoral de larga duración mejorada contra la adicción a la cocaína, en antiguos adictos a las drogas, que presentan una abstinencia prolongada y controlada, pero sometidos a la prueba de provocación para la readquisición farmacológica de comportamiento del consumo adictivo de cocaína.

En el caso de la adicción al tabaco, se han diseñado al menos dos preparados inmunógenos (vacunas) a la sustancia psicoactiva de refuerzo, es decir la nicotina, para aplicación en seres humanos (véase un informe de los trabajos y las referencias examinados en la presente memoria en T. Kosten y D. Biegel, *Expert Rev. Vaccines*, 1(3): 89-97, 2002; K. Kantak, *Drugs*, 63 (4): 341-352, 2003). Los estudios preclínicos han demostrado que estas dos vacunas podían generar bajos a moderados valores séricos de anticuerpos específicos (es decir, 0,05 -0,2 mg/ml de suero) contra la nicotina en roedores vacunados activamente. Además, la vacunación activa con estos preparados inmunógenos de nicotina, demostraron conferir protección inmunológica contra la adquisición del comportamiento del consumo de nicotina en modelos de autoadministración de drogas por vía intravenosa en roedores. El mecanismo inmunoprotector contra la adicción a la nicotina sigue mismo mecanismo mediado por la farmacocinética descrito para la adicción a la cocaína, es decir, mediante la unión de la fracción no unida "libre" de nicotina en el plasma por anticuerpos específicos en el suero, lo que impide la penetración barrera hematoencefálica de este fármaco. Los estudios de fase clínica realizados de forma independiente por Nabi Pharmaceuticals (vacuna contra la nicotina NicVAX) y Xenova Pharmaceutical Group en Bélgica, comunicaron resultados exitosos en la evaluación de las propiedades tóxicas e inmunógenas de estas dos formulaciones de vacunas. Los informes sobre la evaluación de las capacidades de inmunoprotección de estas dos formulaciones de vacuna contra la adicción a la nicotina en voluntarios ex-adictos a las drogas en estudios clínicos de fase II es de esperar que estén listos en los próximos dos años.

De hecho, el desarrollo de estrategias experimentales centradas en el diseño y síntesis de preparados inmunógenos y la validación posterior de protocolos de vacunación para el tratamiento de formas específicas de adicción a las drogas, eran innovadores enfocados a opioides tales como la morfina y la heroína, pero no a la adicción a la cocaína y a la nicotina. Retrospectivamente, al principio de los años 70, diferentes grupos de investigación demostraron la viabilidad de la obtención de una respuesta inmunitaria humoral contra estas dos sustancias opioideas utilizando protocolos de vacunación en modelos animales experimentales, tales como la rata y el conejo (S. Spector y C. W. Parker, *Science*, 168:1347-1348, 1970; S. Spector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178:253-258, 1971; E. L. Adler y C. Liu, *J. Immunol.*, 106:1684-1685, 1971; H. Van Vunakis *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180:514-521, 1972; B. H. Wainer *et al.*, *Science*, 176:1143-1145, 1972; B. H. Wainer *et al.*, *Science*, 178:647-648, 1972 y B. H. Wainer *et al.*, *J. Immunol.* 110:667 -673, 1973). Estos planteamientos experimentales se centraron en la generación de anticuerpos policlonales contra la morfina, mostrando distinto reconocimiento inmunológico cruzado contra la heroína y análogos opioideos estructuralmente relacionados (por ejemplo, codeína, meperidina e hidromorfona). Estos anticuerpos se generaron para su utilización en inmunoanálisis específicos diseñados (es decir, ensayos de radioinmunoanálisis y ensayos ELISA inmunoenzimáticos) para detectar y determinar la morfina y sustancias opioideas relacionadas en fluidos biológicos de seres humanos. Estos estudios demostraron, por primera vez, el logro exitoso en el diseño y validación de la condensación covalente de los grupos 3- y 6-hidroxilo libres expuestos en el anillo fenantrénico de la molécula de morfina a proteínas portadoras tales como BSA, utilizando procedimientos convencionales de química orgánica (procedimientos que todavía se utilizan cuando se aborda la síntesis química de dichos conjugados inmunógenos). Además, es importante mencionar que ninguno de estos procedimientos químicos nunca fueron descritos ni reivindicados en los registros de patentes y se consideran en su mayor parte procedimientos químicos clásicos en libros de texto de química orgánica, al describir el enlace covalente de los grupos 3- y 6-hidroxilo libres del anillo fenantrénico de morfina a proteínas portadoras. En dicho contexto, diferentes grupos de investigación lograron sintetizar dos productos intermedios estructurales de la morfina y se utilizaron para el desarrollo de formulaciones de vacunas, a saber, la (3-O-carboximetilmorfina producto del 3-orto-morfina-carboximetil-éter, véase el ejemplo 2) y la morfina-6-hemisuccinato (véase el ejemplo 3) (S. Spector y C. W. Parker, *Science*, 168:1347, 1970; S. J. Spector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178:253, 1971; H. Van Vunakis *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180:514, 1972; y S. Gross *et al.*, *Inmuochemistry*, 11:453-456, 1974). Con respecto a los

derivados intermedios de morfina mencionados anteriormente utilizados para desarrollar formulaciones de vacunas, dos registros idénticos de patentes publicadas el 13 de septiembre de 1991 (documento CH 678394 A5) y 15 de mayo 1996 (documento EP 0 496 839 B1) de Erich Hugo Cerny, reivindican la invención sobre la síntesis estructural de nuevas formulaciones de vacunas contra la morfina. Sin embargo, vale la pena mencionar, que estos dos registros de patentes no ponen de manifiesto ninguna novedad o invención real con respecto a la síntesis de las formulaciones de vacunas terapéuticas reivindicadas. Este argumento se basa en que ambos registros de patente describen los mismos procedimientos de síntesis convencionales previamente indicados para generar el derivado de 3-O-carboxi-metil-morfina intermedio utilizado para conjugar por enlace covalente la proteína portadora KLH. En ambos casos, se utilizaron a base de morfina y beta-cloroacetato de sodio y alcohol absoluto como reactivos en la mezcla de reacción. El otro derivado intermedio sintético utilizado para activar el enlace covalente entre la morfina y proteínas portadoras, es el éster morfina succinílico ligado al grupo 6-hidroxilo libre de la estructura de anillo fenantrénico de la molécula de morfina, es decir, morfina-6-hemisuccinato, (véase el ejemplo 3) (originalmente descrita por B. H. Wainer *et al.*, *Science*, 176:1143, 1972, Akbarzadeh A. *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30:139-145, 1999). En el mismo contexto de los procedimientos de síntesis mencionados anteriormente utilizados para generar el derivado de 3-O-carboximetilmorfina para sintetizar formulaciones de vacuna, un registro de patente de la vacuna contra la morfina emitida en China (CN1196955), se concedió injustificadamente desde la perspectiva de los inventores, a Han Ying *et al.*, el 28 de octubre, 1998. Estos autores reivindican la innovación y la novedad con respecto a los procedimientos de síntesis y las formulaciones estructurales de preparados de vacunas para diferentes fármacos opioideos, además de la morfina, utilizando los mismos métodos estándar para sintetizar el derivado de la morfina-6-hemisuccinato, como se describió anteriormente (véase en B. H. Wainer *et al.*, *Science*, 176:1143, 1972, A. Akbarzadeh *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30:139-145, 1999). Estos autores utilizaron este derivado intermedio para haptenzar morfina a BSA como proteína transportadora.

El diseño estructural y la síntesis de diferentes formulaciones inmunógenas, donde la morfina se ha haptenzado a proteínas portadoras tales como KLH y BSA, representó la base por la que los autores han utilizado invariablemente procedimientos químicos para unir por enlace covalente los derivados intermedios de la morfina 3-O-carboximetilmorfina y la morfina-6-hemisuccinato a estas proteínas portadoras (tal como se esbozó anteriormente en los estudios experimentales descritos anteriormente, incluyendo los registros de patente anteriormente mencionados), utilizando como agente de reticulación el reactivo químico homobifuncional, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). La EDC reacciona con los grupos carboxilo libre disponibles expuestos en cualquiera de los derivados 3-O-carboximetilmorfina o morfina-6-hemisuccinato, formando así los correspondientes dos subproductos de O-acilurea, que son químicamente reactivos para generar enlaces amida covalentes con los grupos épsilon (ϵ)-amino en la cadena lateral de los restos de lisina de cualquier BSA o KLH (véase el ejemplo 4).

Los estudios mencionados anteriormente que demuestran la viabilidad para generar una respuesta inmunitaria humoral contra la morfina y su opioide semisintético estructural afín, la heroína, condujo a una estudio pionero publicado hace casi 30 años por Bonese (K. F. Bonese *et al.* *Nature*, 252:708-710, 1974). Este estudio fue, de hecho, el informe pionero que demuestra que la vacunación activa con un conjugado inmunógeno de la morfina en un solo animal experimental, el primate *Macacus rhesus* no humano, fue capaz de generar una respuesta inmunitaria humoral mediada protectora que mitiga el comportamiento de autoadministración adictiva a la heroína. La síntesis de este conjugado inmunógeno se logró haptenzando morfina con enlace covalente a la BSA mediante un enlace éster estable formado por la condensación del anhídrido succínico y el grupo 6-hidroxilo en la estructura fenantrénica de la molécula de la morfina. El derivado intermedio sintetizado, morfina-6-hemisuccinilo, a continuación, se unió por enlace covalente al reactivo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), obteniendo de este modo el conjugado inmunógeno completo. La inyección subcutánea repetida de este inmunógeno en el primate desencadenó una respuesta inmunológica humoral con anticuerpos específicos de morfina, que muestra reconocimiento cruzado para la heroína. Además, el enfoque de vacunación activa con este conjugado demostró ser un procedimiento eficaz para mitigar la readquisición del comportamiento de autoadministración intravenosa de heroína en este único primate, previamente adiestrado para autoadministrarse diferentes dosis unitarias de este opioide. Aunque este informe pionero presentó el primer procedimiento exitoso de antagonismo basado en anticuerpos para mitigar el comportamiento de consumo de heroína en el primate, nunca fue patentado y desarrollado para su utilización clínica. Del mismo modo, no se desarrollaron más estudios experimentales relacionados con el diseño, la síntesis y la validación de más formulaciones estructurales nuevas de vacunas contra morfina y/o heroína utilizando proteínas portadoras adecuadas para la vacunación de seres humanos, básicamente debido al hecho de que la BSA no es una proteína portadora autorizada para dichos fines experimentales. La razón principal de que estos estudios inmunofarmacológicos nunca se abordaron en seres humanos con inmunógenos adecuados para la morfina o la heroína podría ser debido, por lo menos en parte, al desarrollo simultáneo y continuo de otros agentes neurofarmacológicos utilizados para tratar la adicción a la morfina y la heroína. Por ejemplo, las drogas sintéticas que presentan actividades agonistas débiles y parcial en el receptor opioideo μ (es decir, metadona y buprenorfina) y otros fármacos que muestran actividades antagonistas en receptores opioideos (por ejemplo, naltrexona y naloxona). Todos estos medicamentos se utilizan actualmente para evitar la recaída a la adicción a la a los opioides.

Basándose en los informes anteriormente mencionados de vacunas experimentales contra la adicción a morfina y/o heroína, que nunca se planteó la vacunación humana, los estudios experimentales preliminares dirigidos por el grupo de investigación de los inventores sirvió de base, para el desarrollo de la presente invención de la formulación

de vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Estos experimentos describen el diseño, síntesis y evaluación de la inmunogenicidad provocada por diferentes modelos estructurales sintetizados de una nueva generación de vacunas contra morfina y/o heroína (B. Anton y P. Leff., 31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, CA. 10 a 16 de noviembre 2001). Dichas formulaciones estructurales de vacunas se sintetizaron inicialmente mediante la uniendo con enlace covalente el derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato (M-6-H) con varias proteínas portadoras tales como BSA, KLH y la proteína recombinante toxina del cólera-subunidad β . Estas reacciones de acoplamiento utilizaban procedimientos de reticulación convencional para enlazar el derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato (M-6-H) al reactivo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Estos datos preliminares experimentales obtenidos de dichos estudios hicieron posible la identificación de las proteínas portadoras experimentales para la haptización covalente de la morfina. Vale la pena mencionar que este trabajo sólo se presentó en una sesión de diapositivas en la International Neuroscience Meeting mencionada anteriormente.

Además, no mostró ninguna información referente a los datos experimentales relacionados con el diseño de los modelos moleculares estructurales de inmunógenos, las metodologías que describen los procedimientos de síntesis, purificación, aplicación y dosificación de estas nuevas vacunas. Por otra parte, tampoco se hicieron referencias o descripciones de la validación de los efectos antiadictivas contra la morfina y la heroína, que se describen en la presente invención de la formulación de la vacuna con la morfina y la heroína bivalente terapéutica contra la adicción a estas sustancias opioideas.

Además del estudio pionero publicado por Bonese y colaboradores, quienes demostraron la eficacia de la vacunación activa con BSA-morfina para mitigar el comportamiento de autoconsumo adictivo de heroína en un único primate, otros grupos de investigación exploraron los efectos inmunoprotectores de la inmunización pasiva contra la morfina, utilizando modelos de comportamiento de autoadministración intravenosa de heroína en roedores (P. R. Pentel *et al.*, *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 9:347-352, 1991). Desde un punto de vista terapéutico potencial, un procedimiento inmunoprotección pasiva contra la morfina y la adicción a la heroína tiene limitaciones prácticas para prolongar y mantener la abstinencia a las drogas opioideas en los seres humanos a largo plazo, a diferencia de los procedimientos de inmunización activa. Estas limitaciones se basan en algunas observaciones prácticas provenientes de los resultados experimentales de modelos de inmunoprotección pasiva (R. A. Goldsby, *Vaccines* En: *Kuby Immunology*, 4^a ed. Freeman and Co., Nueva Cork, N. Y., págs. 449-466, 2001). Estos datos han demostrado la vida media biológica relativamente corta de los anticuerpos monoclonales murinos (3 a 23 días, dependiendo de la clase e isotipo de inmunoglobulina) después de ser administrados *in vivo* en diferentes animales de experimentación. Por lo tanto, la inmunoprotección conferida por administración pasiva de anticuerpos monoclonales murinos en anfitriones no murinos es generalmente de vida corta. Por otra parte, ya que tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales utilizados en terapias de inmunización pasiva se producen frecuentemente a partir de diferentes especies animales (por ejemplo, ratón, conejo, etc.), dichas inmunoglobulinas generalmente se reconocen como moléculas antigénicas extrañas cuando se inyectan en personas. En este sentido, la inmunización pasiva de pacientes con dichas inmunoglobulinas podría desencadenar una respuesta inmunológica humoral rápida contra estas moléculas, que en última instancia produciría respuestas neutralizantes atenuadas en las que los anticuerpos actúan como mediadores y la vida media reducida de estos tipos de inmunoglobulinas en el plasma. Por lo tanto, una vez cebadas dichas respuestas antigénicas contra anticuerpos heterólogos en individuos inmunizados pasivamente, la administración posterior de estos tipos de inmunoglobulinas podría conducir al desarrollo de respuestas inmunológicas anormales de hipersensibilidad tras la administración pasiva repetida de dichas moléculas.

Objetivos y ventajas de la invención

Basado en los antecedentes mencionados anteriormente respecto a las terapias antiadictivas contra el abuso de opioides, específicamente contra la adicción a la morfina y la heroína, se puede concluir que no hay medicamentos eficaces e inocuos aún disponibles en seres humanos para el tratamiento y mantenimiento de la abstinencia prolongada y la prevención de la reincidencia de los comportamientos de consumo de opioides adictivos. Hasta ahora, existen razones para justificar la necesidad actual para el desarrollo, aplicación y validación de nuevos fármacos combinados y estrategias terapéuticas para mantener la abstinencia prolongada con eficacia para la prevención de recaídas en comportamientos del consumo de drogas adictivas para las drogas opioideas muy adictivas tales como la heroína y la morfina en los seres humanos.

Como se mencionó anteriormente, los estudios experimentales anteriores que describen la evaluación preclínica de diferentes estrategias inmunológicas contra la adicción a las drogas en modelos animales, apoyan el potencial enfoque terapéutico de diferentes estrategias inmunoprotectoras contra la adicción a la cocaína, nicotina y opioides (específicamente tanto a la morfina como a la heroína). Estas estrategias incluyen nuevos tratamientos farmacológicos basados en el antagonismo de anticuerpos para el mantenimiento de la abstinencia prolongada y/o la prevención de recaídas en el consumo de drogas y en la adicción a las drogas para las sustancias mencionadas anteriormente en los seres humanos. De hecho, el legado más importante de estos estudios inmunoprotectores contra la adicción a las drogas, es la identificación de los logros experimentales críticos de los estudios tanto de fase preclínica como clínica, que en última instancia podrían conducir a la posible utilización y validación de estas estrategias inmunológicas en seres humanos para mantener la abstinencia prolongada y/o para la prevención de

recaídas durante los trastornos adictivos a drogas ilegales.

En este sentido, se pueden mencionar los siguientes requisitos experimentales que deben cumplirse: a) diseño y síntesis de formulaciones estructurales de vacunas antiadictivas donde el fármaco hapténico está estructuralmente acoplado por enlaces covalentes muy estables (es decir, amida), utilizando compuestos químicos bifuncionales con baja complejidad estructural e inmunogenicidad que mejoran la reticulación covalente del fármaco hapténico con proteínas portadoras permitidas utilizadas en protocolos de vacunación en seres humanos; b) dichas proteínas deberían presentar inocuidad probada, y debería poder conferir una muy alta inmunogenicidad al fármaco hapténico cuando el conjugado fármaco-proteína se administra en protocolos de inmunización activa, c) evaluación sistemática de la respuesta inmunitaria humoral al fármaco hapténico conjugado con la proteína portadora, por lo que los parámetros funcionales de anticuerpos específicos activados tales como sus valores, especificidad y avidéz pueden ser caracterizados adecuadamente después de la aplicación del inmunoconjugado en protocolos de vacunación activa ex profeso; d) seguimiento sistemático de la respuesta inmunitaria humoral durante los protocolos de vacunación activa con el conjugado inmunógeno que contiene la droga adictiva haptenizada, a fin de identificar y evaluar la creación de una respuesta de la memoria humoral a largo plazo y estable la frente a la droga antigénica después de la terminación de los protocolos de inmunización activa, e) evaluación de la capacidad y la eficacia de estas nuevas formulaciones de vacunas terapéuticas contra las adicciones a las drogas (es decir, la morfina y la heroína) con capacidades probadas para conferir protección inmunológica a largo plazo contra las drogas adictivas. Estas vacunas deben presentar un buen índice terapéutico para evitar la readquisición de los comportamientos adictivos en individuos desintoxicados y abstinentes.

La presente exposición se refiere al diseño, síntesis, purificación, aplicación y validación de un modelo estructural de vacuna contra la adicción tanto a la morfina como a la heroína, que cumple todos los requisitos estructurales y funcionales mencionados anteriormente. La descripción detallada de los procedimientos de síntesis y la estructura de este conjugado proteína-morfina portador, se dan a conocer en la presente exposición. Otra información expuesta también en la presente memoria es su utilización en los modelos de inmunización activa en los roedores, el seguimiento y caracterización del desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral después del refuerzo, así como los valores y la especificidad de los anticuerpos generados contra la droga haptenizada. Además, se exponen también datos experimentales que muestran la eficacia probada de la presente exposición de la formulación terapéutica de una nueva vacuna bivalente contra morfina y/o heroína para provocar una fuerte respuesta inmunitaria humoral de los valores altos y constantes de anticuerpos séricos contra la morfina, con especificidad equivalente para la heroína, en individuos desintoxicados y abstinentes adictos a estas sustancias opioideas. Dichos anticuerpos pueden antagonizar (bloquear) de manera eficiente la readquisición de comportamientos de consumo de drogas adictivas y de búsqueda de drogas, además de prolongar el estado de abstinencia contra estas dos sustancias opioideas en individuos hiperinmunes sometidos a la prueba de provocación para readquisición de la droga en un modelo de autoadministración intravenosa adictiva convencional de estas dos sustancias opioideas en la rata.

El primer objetivo de la presente invención es dar a conocer el procedimiento de síntesis y la formulación estructural de un nuevo inmunógeno de morfina según las reivindicaciones, que presenta las siguientes ventajas funcionales y estructurales nunca presentadas en cualesquiera otras formulaciones de vacunas con morfina y/o heroína sintetizadas anteriormente: a) haptenización covalente de morfina a la vacuna antitetánica, una proteína portadora autorizada en protocolos de vacunación activa en seres humanos con probada capacidad para conferir una alta inmunogenicidad a moléculas hapténicas de bajo peso molecular; b) haptenización covalente de la morfina para la vacuna antitetánica, mediante la utilización sucesiva y el enlace covalente de dos reactivos de reticulación diferentes, lo que aumenta la síntesis de un brazo enlazador espaciador inmunógeno largo y bajo colocado entre la proteína portadora y la droga haptenizada; c) este nuevo inmunógeno de morfina se dosificó en protocolos de vacunación activa en individuos, y presentó una eficacia probada para generar una respuesta inmunitaria humoral fuerte y mantenida caracterizada por anticuerpos séricos muy específicos con especificidades equivalentes contra la morfina y su análogo opioideo estructuralmente relacionado y muy adictivo, la heroína.

Otro objetivo de la presente exposición es dar a conocer y validar un modelo de la inmunización activa utilizando el conjugado proteína-morfina portador mencionado anteriormente, para optimizar una respuesta inmunitaria humoral fuerte y mantenida con valores muy altos de anticuerpos anti-hapteno con una respuesta de memoria inmunitaria creada a largo plazo.

Otro objetivo de la presente exposición trata de la demostración para optimizar el valor y la especificidad de anticuerpos, a fin de demostrar su capacidad funcional para el reconocimiento cruzado de la heroína, pero no de otros medicamentos opioideos estructuralmente relacionados con la morfina y/o varios péptidos opioideos endógenos producidos en el cerebro.

Otro objetivo de la presente exposición se refiere a la validación en la utilización de este inmunógeno, como una composición farmacéutica o formulación terapéutica para proporcionar protección inmunológica contra la readquisición de comportamientos adictivos de consumo de morfina y/o heroína y para el mantenimiento de la abstinencia prolongada en individuos experimentales previamente desintoxicados de la adicción a la morfina o heroína.

Un objetivo adicional de la presente exposición da a conocer la síntesis y la estructura molecular de una formulación de vacuna terapéutica contra morfina y/o heroína, validada en estudios preclínicos en el roedor, donde esta formulación de la vacuna que contiene el toxoide tetánico utilizado como proteína inmunógena portadora para la morfina haptenizada por enlace covalente, proporciona su potencial utilización para evaluar sus efectos terapéuticos en estudios clínicos de fases, confiriendo una inmunoprotección a largo plazo, mantenimiento de abstinencia prolongada y prevención de recaídas en individuos desintoxicados de adicción a la morfina o a la heroína.

Un objetivo final de la presente exposición da a conocer la metodología general utilizada para diseñar, desarrollar, aplicar y validar una terapia eficaz e inocua, cuyo mecanismo de acción difiere de los compuestos terapéuticos clásicos actuales disponibles, mediante la mejora de los cambios farmacocinéticos de las drogas opioideas anteriormente mencionadas, lo que reduce eficientemente su penetración en la barrera hematoencefálica, una vez que se han administrado a individuos hiperinmunes, previamente vacunados contra estas dos drogas opioideas.

En conjunto, la presente exposición da a conocer y proporciona una descripción completa de la metodología y los procedimientos necesarios para preparar derivados intermedios para la síntesis de una vacuna con morfina y/o heroína, composiciones farmacéuticas o formulaciones terapéuticas, incluyendo procedimientos y utilizaciones terapéuticas contra la adicción a la morfina y la heroína.

Breve descripción de las figuras

La figura 1, representa un ensayo ELISA de captura de anticuerpos inmunoenzimático representativo que muestra la sólida respuesta inmunitaria humoral provocada por el nuevo inmunógeno vacuna antitetánica-morfina que se caracteriza por altos valores de anticuerpos séricos generados contra este fármaco opioideo;

la figura 2, muestra un gráfico representativo que representa el seguimiento de la respuesta inmunitaria humoral de los valores séricos de anticuerpos de morfina y/o heroína en la rata, cuantificados por ensayos ELISA de captura de anticuerpos, a lo largo de cuatro revacunaciones consecutivas con la nueva vacuna antitetánica-morfina durante el programa de vacunación activa en la rata;

la figura 3, muestra un gráfico representativo de ensayos ELISA inmunoenzimáticos de captura de anticuerpos utilizados para controlar el comportamiento de la respuesta inmunitaria humoral después de la última revacunación (cuarta) con el nuevo inmunógeno vacuna antitetánica-morfina;

la figura 4, representa un gráfico representativo de ensayos ELISA inmunoenzimáticos de captura de anticuerpos utilizados para controlar la recuperación de los valores de anticuerpos específicos de morfina y/o heroína provocados después de una quinta revacunación posterior con el nuevo inmunógeno vacuna antitetánica-morfina;

la figura 5, representa un ensayo ELISA inmunoenzimático competitivo utilizado para evaluar el potencial reconocimiento cruzado de los anticuerpos séricos contra morfina y/o heroína para diferentes análogos a morfina y heroína estructuralmente relacionados, utilizados en el tratamiento antiadictivo clásico contra de estos dos compuestos opioideos, incluyendo los metabolitos de biotransformación de estos dos fármacos, así como diferentes neuropéptidos opioideos endógenos implicados en la regulación de diferentes actividades biológicas fisiológicas y neuronales en el SNC de mamíferos;

la figura 6, muestra el efecto inmunoprotector provocado por la vacunación activa con el inmunógeno vacuna antitetánica-morfina en la rata, para mitigar el comportamiento de autoadministración intravenosa a la heroína en el mismo animal y finalmente;

la figura 7, muestra el efecto inmunoprotector provocado por la vacunación activa con el inmunógeno vacuna antitetánica-morfina en la rata para mitigar el comportamiento de autoadministración intravenosa a la morfina en el mismo animal.

Descripción detallada de la invención

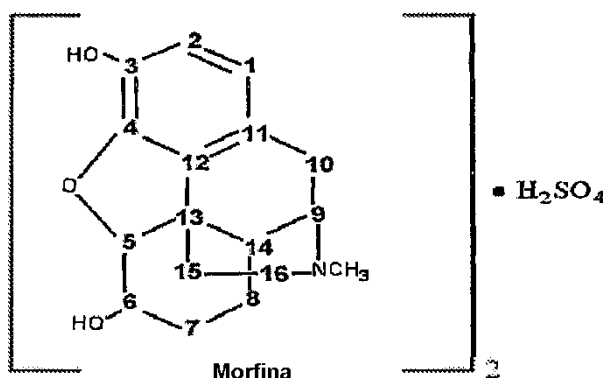
La bibliografía científica a la que se hace referencia en este apartado describe con todo detalle la información disponible para las personas expertas en este campo. La presente exposición da a conocer y proporciona un tratamiento terapéutico para la adicción a la morfina y a la heroína. Este tratamiento se basa en el principio farmacológico que describe la vacunación activa con una nueva formulación estructural de un conjugado de proteína portadora-fármaco hapténico contra estos dos opioideos en individuos previamente adictos y posteriormente desintoxicados. La composición química del conjugado terapéutico de la presente invención consiste en morfina como fármaco hapténico y toxoide tetánico como proteína portadora muy inmunógena, siendo esta última proteína portadora una proteína muy inmunógena autorizada utilizada en los protocolos de vacunación humana. Este conjugado de morfina muy inmunógeno puede estimular la generación de valores de anticuerpos séricos altos y mantenidos contra la morfina haptenizada cuando los individuos desintoxicados contra la adicción a los opioideos reciben esta formulación terapéutica. Por lo tanto, la utilización y aplicación de protocolos de inmunización activa

adecuados, activa la síntesis y aumenta la generación de valores altos de anticuerpos contra la morfina en el suero que reconocen y se unen con gran especificidad y avidez a la fracción no unida "libre" de fármaco en el plasma, después de una reexposición posterior del fármaco. Este proceso finalmente conduce a una neutralización y/o prevención significativa de la penetración de la barrera hematoencefálica del fármaco opioideo, disminuyendo o evitando de ese modo de manera significativa las propiedades reforzadoras de los opioides en el cerebro. Por lo tanto, la morfina y/o la heroína se neutralizan antes de alcanzar el tejido cerebral, y de este modo, el individuo adicto desintoxicado no es recompensado por las propiedades farmacológicas de refuerzo de estas dos drogas, que representan en última instancia, el "sistema conductor farmacológico" subyacente mediante el cual estos dos opioides mejoran sus actividades de drogas reforzadoras en las vías de recompensa del cerebro. El modelo de inmunización activa que provoca la actividad neutralizante de estos opioides se produce durante un período de larga duración (es decir, 3 a 6 meses) en los individuos vacunados tratados con la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína de la presente invención. Esto es debido generalmente a la actividad durante el largo período de la respuesta inmunitaria humoral que neutraliza estos fármacos opioideos en el plasma, en la que actúan como mediadores los anticuerpos séricos específicos generados contra la droga hapténizada. En este sentido, cabe esperar que la estabilidad a largo plazo establecida de la respuesta inmunitaria, en la que actúa como mediadora la generación de valores elevados de anticuerpos contra drogas hapténicas, provocados por la composición terapéutica de la presente invención, representa un mecanismo inmunógeno eficaz para mantener abstinencia prolongada y/o evitar la recaída en la adicción a la morfina y la heroína en individuos previamente desintoxicados. Además, la estrategia de vacunación terapéutica contra la adicción a morfina y/o heroína de la presente exposición es compatible con otras terapias utilizadas actualmente para mantener la abstinencia prolongada y/o la prevención de la recaída en la adicción a los opioides. En este sentido, un gran número de agentes farmacológicos utilizados con estos fines terapéuticos, como la metadona, buprenorfina, naloxona, naltrexona, etc., comprenden entre muchos otros medicamentos farmacológicos relacionados, los compuestos terapéuticos más seleccionados utilizados en clínicas, que pueden utilizarse simultáneamente con la terapia de vacunación dada a conocer en la presente exposición.

Ejemplos

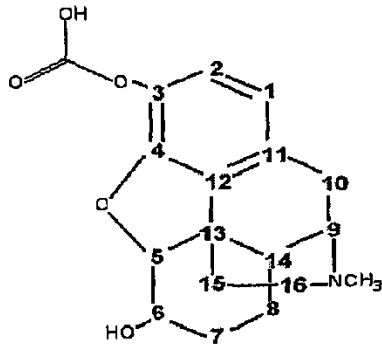
1. Representación esquemática de la estructura molecular de la formulación química comercial de morfina utilizada como hapteno para la preparación de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína.

La formulación química comercial (Sigma-Aldrich) de la sal sulfato de morfina pentahidratado (P.M. 758,8, $C_{34}H_{40}N_2O_{10}S$) se utilizó como compuesto de partida para la síntesis de la base de morfina (véase más adelante el párrafo (a), en el apartado que describe "Proceso de reacción para la preparación de derivados intermedios utilizados para la síntesis de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína") y a continuación para la síntesis del derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato. Este último derivado intermedio fue posteriormente hapténizado a los grupos épsilon amino libres de la cadena lateral de los restos de lisina expuestos en el toxoide tetánico mediante la reticulación covalente sucesiva con los reactivos de reticulación homo- y hetero-bifuncional, EDC y TFCS, respectivamente.



2. Representación esquemática de la formulación estructural del derivado intermedio 3-O-carboxi-metil-morfina.

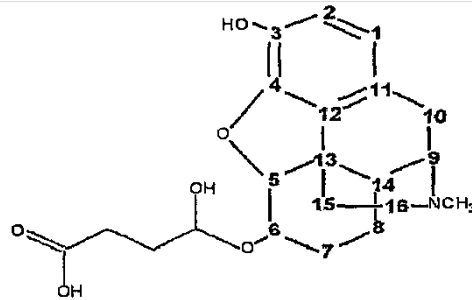
Este derivado intermedio de la morfina ha sido sintetizado y utilizado por varios grupos de investigadores y también se utilizó en la presente invención para la hapténización covalente de la morfina para la vacuna antitetánica, como una vacuna bivalente alternativa contra la adicción a la morfina y la heroína;



3-O-carboxi-metil-morfina

3. Representación esquemática de la formulación estructural del derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato.

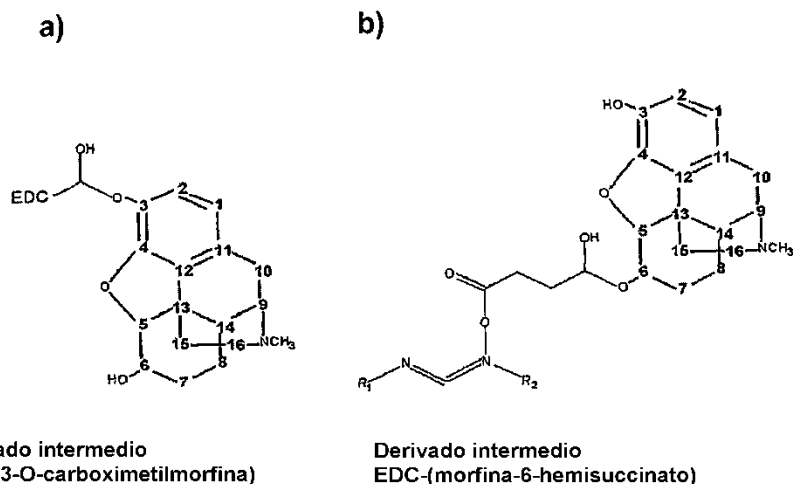
5 Este derivado intermedio de la morfina se ha sintetizado y utilizado por varios grupos de investigadores y se ha utilizado en la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína para la haptización covalente de esta sustancia opioidea para la vacuna antitetánica;



Morfina-6-hemisuccinato

4. Representación esquemática de la formulación estructural de los derivados intermedios 3-O-carboximetilmorfina y morfina-6-hemisuccinato condensados covalentemente con la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

15 El reactivo químico 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) ha sido utilizado por varios investigadores en reacciones haptización covalente del derivado intermedio 3-O-carboximetilmorfina a proteínas portadoras tales como KLH y BSA. La EDC también se utilizó para la haptización covalente del derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato para el producto intermedio complejo vacuna antitetánica-TFCS en la presente invención de la
 20 vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína (véanse los esquemas de reacción de síntesis química en los ejemplos 5 (a-c) y 7 (a y b).



Síntesis de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína.

5 La síntesis del conjugado inmunógeno de morfina en la presente invención requiere la modificación química inicial de la molécula de morfina para generar un derivado estructural muy reactivo de este opioide que proporciona grupos carboxilo libres reactivos, que se utilizan para la reticulación covalente de dos reactivos heterobifuncionales utilizados para formar la estructura química del brazo enlazador espaciador que se une a los grupos épsilon amino de la cadena lateral de los restos de lisina expuestos en la vacuna antitetánica, proteína portadora utilizada en la presente invención (véase el ejemplo 6). Los procedimientos de la química de acoplamiento utilizados para modificar la estructura y activar ambos grupos 3 y 6 hidroxilo reactivos del anillo fenantrénico de la molécula de morfina para reticular reactivos heterobifuncionales son muy escasos (Robert T. Morrison y Robert N. Boyd, *Organic Chemistry*, 7^a ed., 2003), y sólo se han publicado muy pocos procedimientos que utilizan estos métodos de síntesis química. En este sentido, desde el principio de los años 70, diferentes grupos de investigación (B. Wainer *et al.*, *Science* 176: 1143-1145, 1972; B. Wainer *et al.*, *Science* 178: 647, 1972; B. Wainer *et al.*, *J. Immunol.* 110 (3): 667- 673, 1973; Wainer *et al.*, *Nature*, 241:537-538, 1973 y B. Hill *et al.*, *J. Immunol.* 114:1363-1368, 1975); publicaron una metodología basada en la química clásica, no patentada que se encuentra hoy en día en los libros de texto de química orgánica, que utiliza anhídrido succínico como reactivo para modificar el grupo 6-hidroxilo reactivo de la estructura de anillo fenantrénico de la molécula de morfina. Este intermedio primario de morfina, denominado morfina-6-hemisuccinato (véase el ejemplo 3, y la estructura (b) en el ejemplo 5) se diferencia de la morfina en su ácido carboxílico libre muy reactivo del grupo éster succinílico (anteriormente unido a la molécula de morfina) que puede estar unido por enlace covalente (véase la estructura (a) en el ejemplo 5) a reactivos homobifuncionales de reticulación tales como la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (véase el ejemplo 3, y la estructura (c) en el ejemplo 5). Este reactivo se ha utilizado ampliamente en las reacciones químicas de reticulación covalente para la condensación covalente de grupos funcionales amino y carboxilo libres procedentes de moléculas donantes (S. Hockfield *et al.*, *Molecular Probes of the Nervous System: Selected Methods for Antibody and Nucleic Acid Probes*, vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva Cork., 1993).

30 Como la morfina no es una molécula inmunógena por sí misma, la generación de respuestas inmunitarias humorales con valores altos de anticuerpos específicos contra moléculas de complejidad estructural relativamente baja como este opioide representa un serio desafío metodológico. En la presente exposición, la estructura del conjugado de morfina fue diseñada inicialmente y seguido de la síntesis del derivado intermedio morfina-6-hemisuccinato (estructura (b) en el ejemplo 5) que a su vez estaba hapténizada por enlace covalente a restos de lisina en la vacuna antitetánica, que se utilizan como proteína portadora, mediante la síntesis consecutiva de un brazo espaciador-enlazador, estructuralmente conformado por la condensación química de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (denominada como el compuesto EDC comercial, véase el ejemplo 5) y el éster de N-(ϵ -trifluoroacetilcaproiloxi)-succinimida (denominada como el compuesto comercial TFCS, véase el ejemplo 6). Este procedimiento, basado en la condensación covalente de la morfina hapténizada al toxoide tetánico mediante este largo brazo espaciador-enlazador, formado por la condensación covalente de los reactivos EDC y TFCS, permite la conservación estructural de la molécula de morfina una vez hapténizada con la vacuna antitetánica. En este contexto estructural, cabe esperar que la morfina siga estando fijada a la proteína portadora de tal manera que podría mantener su configuración estérica original. Esto, en principio, podría facilitar que otros dominios y/o grupos reactivos libres dentro de la molécula de morfina, aparte de los dominios activos del fármaco opioide que contribuyen a la hapténización covalente con la proteína portadora, podrían exponerse y contribuir como dominios antigénicos predominantes o determinantes antigénicos en la molécula de fármaco natural reconocidos por la respuesta inmunitaria humoral. Además, la naturaleza química de la estructura hidrocarbonada del brazo espaciador-enlazador (véase el ejemplo 6) dota a esta cadena principal de carbono de una estructura inerte completa a cualquier reactividad química, y de ese modo, de una muy baja inmunogenicidad de por sí. Estas propiedades estructurales y funcionales conferidas por el brazo enlazador hidrocarbonado podría contribuir a la

función epitógena inmunopredominante de la morfina en la formulación estructural de la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Así pues, las capacidades propuestas anteriormente, las ventajas estructurales y funcionales de la presente invención se apoyan en los resultados experimentales que muestran su gran eficacia para producir una fuerte respuesta inmunitaria humoral (véanse las figuras 1 y 2), con altos y mantenidos valores de anticuerpos séricos específicos (véanse las figuras 3 y 4) que se reconocen en cruz con la morfina no haptenizada con especificidad equivalente, incluyendo los análogos estructurales de opioides, heroína y los metabolitos de opioide endógenos, tales como la 6-monoacetilmorfina y sus subproductos activos (adictivos) de glucurónido (es decir, morfina-3-6-glucurónidos) (véase la figura 5). La explicación más plausible para la especificidad de esta respuesta inmunitaria humoral desencadenada por el modelo novedoso de vacuna de la invención contra estos compuestos opioideos se basa en la presentación antigénica de diferentes dominios estructurales de morfina para el sistema inmunológico. Esto parece ser debido a la longitud estructural del brazo espaciador enlazador que separa la morfina del toxoide tetánico de tal manera que permite que el sistema inmunitario reaccione contra determinantes antigénicos específicos de la estructura fenantrénica de la morfina compartida por otros análogos opioideos estructurales y también sus metabolitos endógenos (es decir, la heroína y los morfina-3-6-glucurónidos).

5. Procedimientos y reacciones utilizados para la preparación del derivado intermedio de morfina necesario para la síntesis de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína

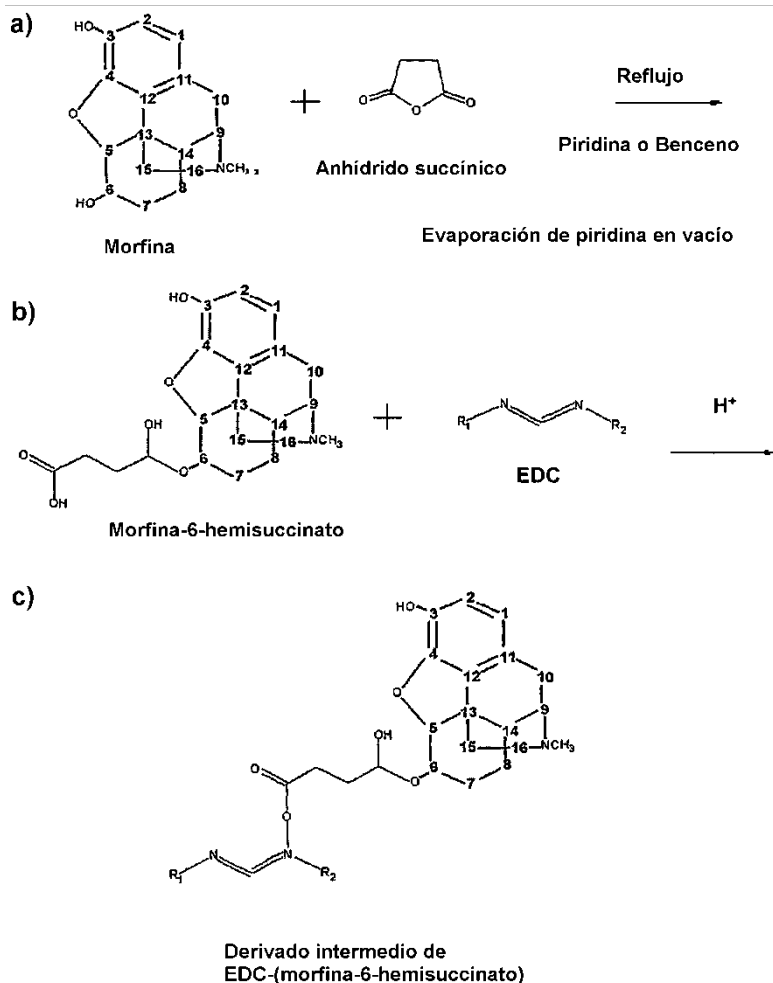
a) Preparación inicial de la base de morfina procedente de la sal sulfato de morfina pentahidratada (formulación química de morfina disponible en el mercado).- La base de morfina (estructura de (a) del ejemplo 5) se sintetizó a partir de la sal sulfato comercial de esta sustancia opioidea (Sigma-Aldrich), según un procedimiento de química clásica publicado en 1972 por E. J. Simon (E. J. Simon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1835-1837, 1972). Esta reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: se disolvieron 64 mg de sulfato de morfina/ml en agua destilada a temperatura ambiente con agitación constante. El pH de esta solución se ajustó a 8,0 con NH₄OH. La base de morfina se cristalizó posteriormente por precipitación a pH 8, se filtró y se secó por evaporación a 60°C en condiciones de vacío.

b) Preparación del derivado intermedio de morfina-6-hemisuccinato (M-6-H). El compuesto M-6-H se preparó a partir de la base de morfina, según el siguiente protocolo y se sometió a modificaciones de los procedimientos pioneros estándar publicados en los años 70 por B. Wainer *et al.*, *Science*, 176:1143-1145, 1972; B. H. Wainer *et al.*, *Science*, 178:647, 1972, B. Wainer *et al.*, *J. Immunol.* 110 (3): 667-673, 1973; Wainer *et al.*, *Nature*, 241:537-538, 1973 y B. Hill *et al.*, *J. Immunol.* 114:1363-1368, 1975. El procedimiento de reacción química se realizó de la manera siguiente: por cada gramo de base de morfina, se añadieron a la mezcla de reacción 2 gramos de anhídrido succínico (Sigma-Aldrich), seguido de incubación con 20 ml de piridina o benceno anhídrido a reflujo continuo en un matraz de vidrio. Después de calentar la mezcla de reacción durante un máximo de 6 horas a temperatura de reflujo (70-80°C), la mezcla de reacción se enfrió lentamente a temperatura ambiente y se decantó el exceso de piridina o benceno. El resto de estos últimos componentes orgánicos se evaporó utilizando una corriente continua de nitrógeno a presión reducida, produciendo un residuo de producto anhídrido representado por M-6-H. Este producto se expuso a 10 períodos de lavado con etanol al 60% en agua destilada para conseguir la recristalización del residuo de M-6-H (ejemplo 5 (b)). El rendimiento en porcentaje del producto se analizó por un método analítico cuantitativo convencional, utilizando el análisis de cromatografía en capa fina (TLC, siglas de la nomenclatura convencional abreviada de este método) (B. Wainer *et al.*, *Science* 176:1143-1145, 1972). Este método se planteó de la manera siguiente: 100 µg del residuo sintético M-6-H y una cantidad equivalente de base de morfina (compuesto utilizado como referencia) se disolvieron en el sistema disolvente de acetato de etilo:metanol:hidróxido de amonio (85:10:5, v:v:v), seguido de muestreo 1 µl/carril, se secó a temperatura ambiente y se introdujo en la matriz de cromatografía en capa fina de sílice con el sistema disolvente mencionado anteriormente. Una vez los compuestos se han introducido en el cromatógrafo, la capa fina de sílice se expone a la estimulación en la lámpara UV a 285 nm, (esta longitud de onda se utiliza normalmente para excitar el cromóforo representado por el anillo fenólico de la estructura fenantrénica en la morfina libre y M-6-H, respectivamente). En este sentido, el perfil de la TLC del residuo sintético M-6-H presentaba un coeficiente de movilidad relativa (R_f, sus siglas en inglés abreviadas convencionales [Retention factor]) de aproximadamente 0,1-0,15, mientras que el basado en morfina libre presentaba un R_f mayor de aproximadamente 0,3-0,4. El rendimiento medio del producto M-6-H en una reacción de síntesis convencional fue siempre aproximadamente el 95% o más.

c) Preparación del derivado intermedio de EDC-morfina-6-hemisuccinato

Para conseguir la haptenización covalente de M-6-H con la proteína portadora, el derivado intermedio M-6-H se conjugó por enlace covalente mediante su grupo succinil-carboxilolibre al reactivo reticulador covalente homobifuncional, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Pierce) (véase la figura (c) en el ejemplo 5), según el protocolo estándar descrito por el fabricante (Pierce). Durante esta reacción de condensación, el exceso de EDC que no reaccionó con el grupo succinil-carboxílico se hidroliza rápidamente a un compuesto derivado intermedio no reactivo, debido a la alta inestabilidad de este reactivo cuando se coloca en una solución acuosa. Por lo tanto, una reacción de acoplamiento estándar consistió en mezclar 100 mg de EDC por cada 100 mg de M-6-H disuelto en 100 ml de H₂O destilada, a pH 5,5, ajustado con una solución HCl 1N.

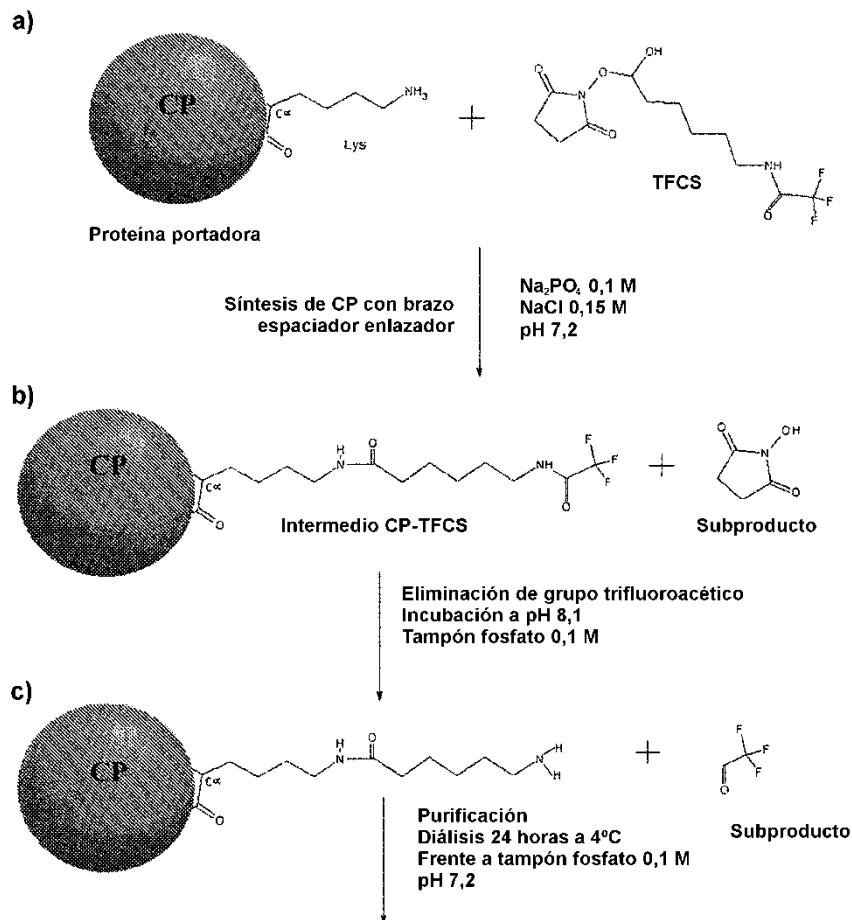
La mezcla de reacción se incubó a continuación a 37°C durante 2 horas con agitación constante. En estas condiciones, se obtiene regularmente un rendimiento de aproximadamente 98% de producto EDC-(M-6-H) en estas condiciones de acoplamiento. Esta estimación se obtuvo por valoración de los grupos carboxílicos libres de muestras equivalentes de ambos productos M-6-H, utilizados como referencia, y el producto EDC-(M-6-H) con solución de NaOH 1 N, un procedimiento bioquímico estándar utilizado normalmente para verificar la presencia de grupos carboxílicos libres en valores de pK de alrededor de 4,2. Este procedimiento de reacción genera rendimientos óptimos de producto sintético EDC-(M-6-H), que suele ser inestable en soluciones acuosas y por lo tanto, necesita reaccionar rápidamente con grupos amino procedentes del derivado intermedio vacuna antitetánica, cuya síntesis se da a conocer en la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína, y sirve como proteína portadora de la misma invención.



6. Proceso de reacción utilizado para la preparación del derivado intermedio del toxoide tetánico utilizado como proteína transportadora (CP) condensado por enlaces covalentes con el éster de N-(ε-trifluoroacetilcaproiloxi)-succinimida (TFCS): complejo CP-TFCS.

La preparación del toxoide tetánico utilizado como proteína transportadora (CP) en la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína, tenía grado certificado de pureza ($\geq 98\%$) y una falta total de toxicidad. Esta preparación de la proteína está formada por la subunidad polipéptido H, que contiene aproximadamente 858 restos de aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. Esta subunidad proteica obtenida mediante técnicas de recombinación de ADN convencionales, está codificada por el gen de *Clostridium tetani*, que produce la toxina del tétanos bacteriana natural, y contiene sólo 68 copias de los restos de lisina a lo largo de su secuencia de aminoácidos primaria de la proteína de la vacuna con polipéptido H, mientras que la toxina natural del tétanos se compone de una proteína de 1313 aminoácidos, lo que hace su alto peso molecular de 150.700 daltons (150,7 kDa). Para conseguir la síntesis de la vacuna antitetánica-intermedio reactivo TFCS, los sitios ε-amino de restos de lisina expuestos en esta proteína están conjugado por enlace covalente con el éster de N-(ε-trifluoroacetilcaproiloxi)-succinimida (TFCS, Pierce) (véanse las figuras (a), (b) y (c) en el ejemplo 6). La TFCS es un reactivo reticulador covalente heterobifuncional utilizado para conjugar, a pH 7-7,5, grupos ε-amino libres en la cadena lateral de los restos de lisina expuestos de proteínas de alto peso molecular, a través de su zona activa éster de N-hidroxisuccinimida. Por lo tanto, esta reacción aumenta la síntesis de vacuna

antitetánica-derivado intermedio TFCS mediante la formación de enlaces amida estables. En la figura (b) en el ejemplo 6 se describe el procedimiento de reacción utilizado para sintetizar la vacuna antitetánica-TFCS conjugado como un paso intermedio necesario para la síntesis de la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Los procedimientos de acoplamiento y las condiciones experimentales utilizadas para llevar a cabo una síntesis típica de este complejo proteína portadora-TFCS consistieron en la preparación inicial de 40 mg/ml de una solución madre de TFCS (134 mM) (preparada reciente y siempre inmediatamente antes de su uso) disuelta en una solución que contiene 10-20% de DMSO/90-80% de H₂O desionizada (v:v) El reactivo TFCS se mezcla inmediatamente con la proteína de la vacuna antitetánica, en una relación en exceso molar de TFCS 10-20 veces con respecto a la propia vacuna. Así, por ejemplo, una reacción típica consiste en la mezcla de 100 mg (0,5 mM) de toxoide tetánico disuelto en 4 ml de una solución que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS = 0,1 M de PB/NaCl 0,15 mM, pH 7,2) con 50 µl de la solución madre de TFCS (la concentración final de TFCS y DMSO conseguida en la mezcla de vacuna antitetánica-solución de TFCS es 6,7 mM y 0,5-1%, respectivamente). Es digno de mención, el hecho de que el concentración inicial de DMSO durante la reacción de condensación covalente entre la proteína portadora y el reactivo TFCS debe alcanzar una dilución final 1:10-20 (v:v), para evitar la formación de precipitados de proteína en la mezcla. La reacción de condensación que ocurre entre el toxoide tetánico y TFCS debe tener lugar a temperatura ambiente durante 60-90 minutos, a fin de conseguir la síntesis completa del producto vacuna antitetánica-TFCS. Este producto derivado intermedio aún conserva un grupo amino reactivo químicamente protegido por un grupo trifluoroacetilo (véase la figura (b) en el ejemplo 6), que es posteriormente hidrolizado después de exponer el producto a un período de incubación adicional de 2-3 horas a temperatura ambiente en una solución de PBS, pH 8-8,5. El pH de esta última solución tamponada con fosfato se debe ajustar con una solución de NaOH 10 N. En estas condiciones experimentales, los grupos amino reactivos libres en el compuesto TFCS conjugado se generan en el sitio del extremo desprotegido del complejo vacuna antitetánica-TFCS (véase la figura (b) en el ejemplo 6). Este producto final vacuna antitetánica-derivado intermedio TFCS se expone posteriormente a procedimientos de purificación utilizando protocolos convencionales de diálisis. En resumen este método consiste en incubar el conjugado vacuna antitetánica-TFCS, colocado dentro de una membrana de diálisis de umbral 10 kDa (Sigma-Aldrich) frente a tres cambios de 6 litros de solución 0,1 M de tampón fosfato, pH 7,2, a 4°C cada 8 horas durante un período de 24 horas.



7. Derivados del intermedio vacuna antitetánica-TFCS: Síntesis de la formulación estructural final de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína

La condensación covalente del producto intermedio de la morfina, el EDC-(M-6-H) para el complejo vacuna antitetánica-TFCS (véase la figura (a) en el ejemplo 7) se consigue mediante un enlace covalente amida estable, formado después de la reacción entre los grupos carboxilo libres expuestos al final del conjugado EDC-(M-6-H) y los grupos amino libres no protegidos del reactivo TFCS unido al toxoide tetánico (el complejo molecular TFCS-vacuna antitetánica, véase la figura (b) en el ejemplo 7).

Debido a que los procedimientos de síntesis completa y de purificación del derivado vacuna antitetánica-TFCS requiere como máximo un periodo de 24 horas, la síntesis del conjugado EDC-(M-6-H) debe llevarse a cabo justo después de la finalización de las etapas de reacción-purificación del conjugado vacuna antitetánica-TFCS. Esto es debido principalmente al hecho de que el producto EDC-(M-6-H) es muy inestable y fácil de hidrolizar cuando se expone a almacenamiento prolongado (es decir, más de dos horas), incluso a temperaturas inferiores a 10°C. Otras cuestiones importantes que requieren una atención considerable para la optimización de la condensación covalente entre el conjugado EDC-(M-6-H) y el producto vacuna antitetánica-TFCS, hacen referencia a la concentración de los reactivos añadidos en la reacción química. El toxoide tetánico se utiliza como proteína portadora, presenta un peso molecular de aproximadamente 100 kDa, conteniendo un número aproximado de 68 restos de lisina. Los grupos ϵ -amino expuestos (zonas activas) en la cadena lateral de estos restos de aminoácidos, permiten la condensación covalente de TFCS durante la síntesis de la presente invención de la vacuna bivalente contra la morfina y la heroína. En este sentido, cada μ mol de toxoide tetánico (100 mg) contiene una densidad aproximada de hasta 0,07 μ mol de zonas activas disponibles (grupos amino libres no protegidos) que podrían estar unidos por enlaces covalentes con el reactivo TFCS. Además, la reacción de condensación de la invención entre el derivado intermedio EDC-(M-6-H) y el conjugado vacuna antitetánica-TFCS utiliza una relación estequiométrica mol:mol de 100 μ mol de la EDC-(M-6-H) por cada 0,07 μ mol de grupos amino del conjugado vacuna antitetánica-TFCS.

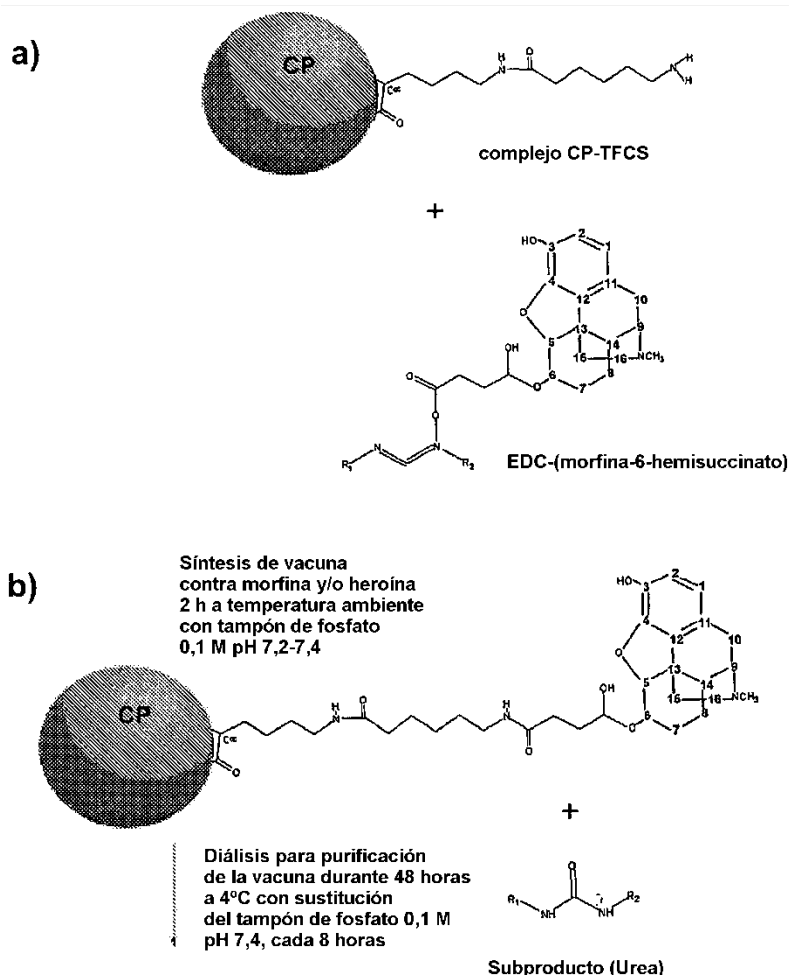
En una formulación típica de la condensación covalente entre el derivado intermedio EDC-(M-6-H) y el conjugado vacuna antitetánica-TFCS, la concentración de los reactivos y las condiciones de reacción requieren la mezcla de 100 mg de complejo vacuna antitetánica-TFCS (1 μ mol de vacuna antitetánica-TFCS = 0,07 μ moles de grupos amino libres/zonas activas), más 30 mg del derivado intermedio EDC-(M-6-H) (70 μ mol de zonas activas para la condensación covalente), disuelto en 100 ml de solución tampón fosfato 0,1 M/NaCl 0,15 M, ajustando el pH a 7-7,5 (siendo la masa molecular calculada del compuesto EDC-(M-6-H último) de hasta 426,37 daltons). La mezcla de reacción se incubaba a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas con agitación constante. El producto sintético obtenido, morfina-6-hemisuccinil-vacuna antitetánica, se purifica a continuación, utilizando procedimientos de diálisis convencionales que utilizan membranas de diálisis de 10 kDa de umbral (Sigma-Aldrich) frente a seis cambios de 6 litros de solución de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, a 4°C, durante un período de 48 horas, a fin de eliminar los subproductos formados durante la reacción, tales como la urea y el derivado intermedio no haptenizado EDC-(M-6-H).

Una vez que la purificación de la morfina-6-hemisuccinil-vacuna antitetánica se ha completado, la solución dializada se esteriliza posteriormente por filtración en filtros de membrana de 0,45 μ m de tamaño de poro (Gelman Sci) a presión positiva. Por último, alícuotas de 1 ml de la solución filtrada se secan por congelación, se liofilizan en viales de vidrio estériles, se sellan al vacío y se conservado en almacenamiento a 4°C. Se pueden añadir varios agentes utilizados normalmente para estabilizar y evitar la degradación de conjugados durante los procedimientos de liofilización y almacenamiento (E. Harlow y D. Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (1988) a la formulación terapéutica de la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Ejemplos de agentes seleccionados, se componen de gelatina, peptona, dextrina, metil-celulosa, sacarosa, lactosa, maltosa, glucosa, fructosa, sorbitol, glicerol, manitol, inositol, ácido cítrico, ácido tartárico, polietilenglicol y polividona, entre muchos otros. Cada vial del producto de vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína contiene una dosis media de alrededor de 1 mg de producto liofilizado de toxoide tetánico utilizado como "dosis unitaria de referencia". La concentración de proteínas de cada dosis unitaria de la vacuna bivalente se determinó por un método de análisis cuantitativo de proteínas convencional que utiliza un kit de reacción de ácido bicinconínico, según los procedimientos recomendados por el fabricante (Pierce Chemical). La determinación cuantitativa del porcentaje de incorporación del derivado intermediario EDC-(M-6-H) condensado de forma covalente a los grupos amino libres del complejo vacuna antitetánica-TFCS se llevó a cabo por procedimientos estándar de valoración, utilizando el reactivo de o-ftaldehído para valorar el número de grupos amino libres del derivado intermedio vacuna antitetánica-TFCS (J. Cashman *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 293: 952-961, 2000). Normalmente se consiguen porcentajes de rendimiento de hasta el 75 a 85% de conjugación de hapteno (morfina) con la proteína portadora (vacuna antitetánica) en la presente formulación de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína.

El producto final obtenido se puede utilizar a continuación, en experimentos de inmunización activa contra la morfina y la heroína y/o utilizarse como antígenos adsorbidos en fase sólida en ensayos inmunológicos (es decir, ensayos ELISA).

En la presente exposición, se sintetizó un conjugado morfina-6-hemosuccinil-BSA en paralelo a la presente

5 invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína utilizando protocolos de síntesis similares para esta última vacuna. La justificación para sintetizar este conjugado adicional de morfina, era para utilizarlo como un antígeno de morfina adsorbido a la fase sólida de los ensayos inmunoenzimáticos ELISA de captura de anticuerpos. Estos últimos ensayos se utilizaron para identificar, controlar, cuantificar (figuras 1, 2, 3 y 4) y validar la especificidad (figura 5) de la respuesta inmunitaria humoral provocada por vacunación activa con la formulación terapéutica de la presente vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína.



10 8. Estructura molecular de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína

La formulación estructural de la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína presenta por primera vez la utilización del reactivo químico, TFCS, utilizado para la síntesis de un largo brazo separador-enlazador para haptenizar la morfina y/o la heroína a la vacuna antitetánica.

15 Se calcula un tamaño molecular total de hasta 20,15 Å para el brazo espaciador-enlazador que separa la morfina haptenizada unida por enlace covalente por el átomo de carbono 6 en su estructura de anillo fenantrénico. El tamaño de este brazo espaciador-enlazador es significativamente más largo (véase la figura del ejemplo 8) de los utilizados para sintetizar los inmunógenos de morfina descritos anteriormente. Estos últimos inmunógenos utilizaron el reactivo EDC como reticulador homobifuncional para unir por enlace covalente la 3-O-carboximetilmorfina y/o M-6-H a los grupos ε-amino de restos de lisina expuestos en cualquiera de las moléculas de BSA o KLH, utilizadas como proteínas portadoras de referencia. Por ejemplo, el conjugado inmunógeno de morfina-6-hemisuccinil-BSA o morfina-6-hemisuccinil-KLH contiene un tamaño del brazo espaciador-enlazador de alrededor de 12,4 Å, porque carecen de la extensión en el átomo de carbono 6 producida por la cadena hidrocarbonada del reactivo TFCS. La adición de esta cadena hidrocarbonada del TFCS en la formulación de la vacuna de la invención aumenta la longitud del brazo enlazador-espaciador total en alrededor de 7,74 Å, (véase la figura de ejemplo 8). Como se mencionó anteriormente, esta innovación estructural del aumento de longitud del brazo espaciador-enlazador en el nuevo modelo de vacuna contra la morfina y la heroína de la invención dado a conocer en la presente invención presenta importantes capacidades funcionales. Estas están demostradas por los siguientes resultados experimentales: a) alta inmunogenicidad generada contra la morfina y/o la heroína haptenizada; y b) una capacidad superior que desencadena una respuesta inmunitaria humoral fuerte con valores altos y mantenidos de anticuerpos específicos

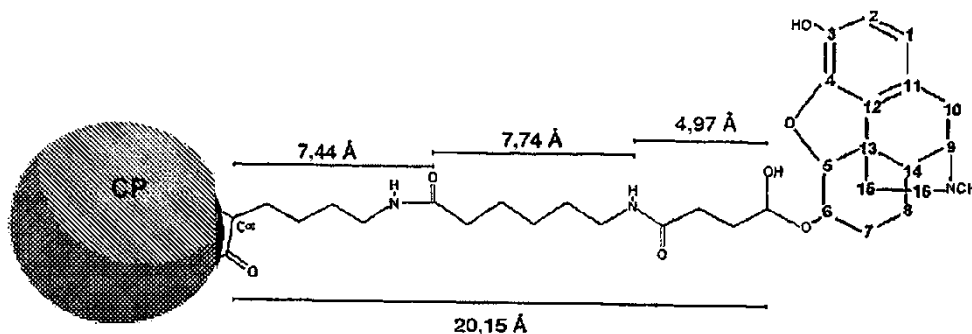
20

25

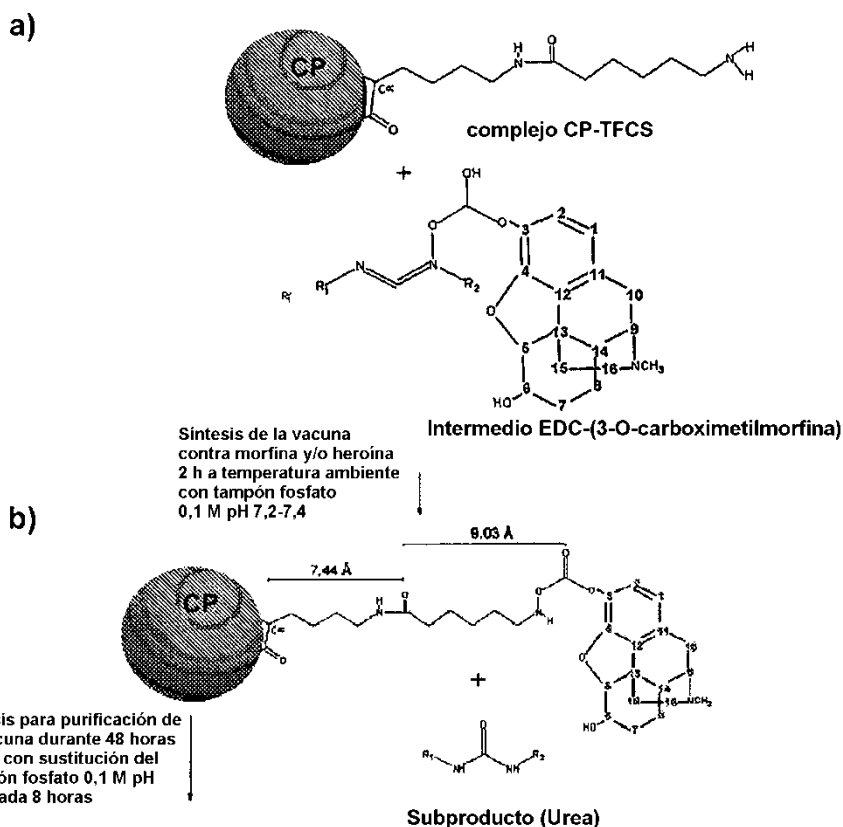
30

5
10
15
contra la morfina sérica (figuras 1, 2, 3, y 4) que presentan reconocimiento cruzado equivalente a este opioide y su análogo estructural, la heroína (figura 5). Por otra parte, es factible plantear la hipótesis de que el aumento de la longitud de este nuevo brazo espaciador-enlazador introducido en la formulación estructural del modelo de vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína de la invención, ofrece ventajas estructurales y funcionales, basadas en la respuesta inmunitaria humoral producida por este inmunógeno, donde los anticuerpos séricos reconocen con especificidad equivalente los epítomos inmunógenos expuestos por la molécula de morfina hapténizada al sistema inmunitario de los animales vacunados que son compartidos por la heroína y sus metabolitos endógenos 3-monoacetil-morfina y los 3- y 6-morfina-glucuronidos (figura 5). Además, la vacunación activa con el nuevo inmunógeno bivalente de la morfina y la heroína de la invención, dado a conocer en la presente invención, puede utilizarse como un procedimiento terapéutico eficaz para provocar una fuerte respuesta inmunitaria humoral capaz de proteger inmunológicamente contra la adquisición de comportamientos adictivos a estos dos compuestos opioideos en el anfitrión vacunado activamente. Por último, esta respuesta inmunitaria humoral provocada por la vacunación activa en el anfitrión, puede ofrecer una inmunoprotección contra la actividad endógena de los metabolitos endógenos mencionados anteriormente tanto de la morfina como de la heroína, demostrada porque presentan propiedades adictivas de refuerzo en individuos desintoxicados y en abstinencia de su adicción a estos compuestos opioideos (figuras 6 y 7).

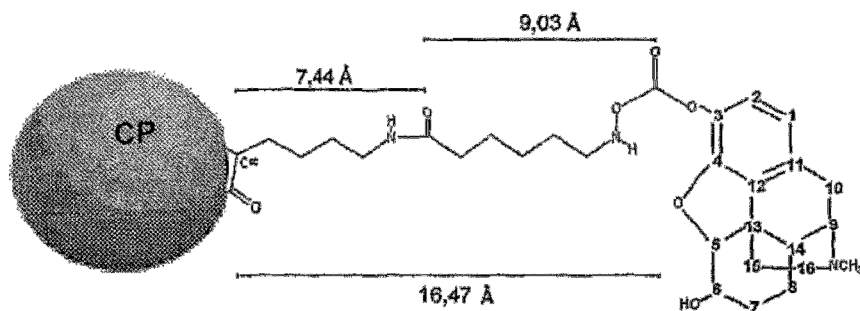
20
25
En resumen, el brazo espaciador-enlazador presenta un tamaño molecular de 20,15 Å, donde el segmento del centro de 7,74 Å corresponde a la cadena principal hidrocarbonada introducida por el reactivo TFCS, que se ha conjugado por enlace covalente con los grupos ε-amino de restos de lisina expuestos en la proteína portadora de la vacuna antitetánica; el segmento del extremo de 7,44 Å comprende el átomo de carbono α y los siguientes cuatro átomos de carbono de la cadena lateral de restos de lisina y el segmento condensado de 4,97 Å comprenden el resto hemisuccinilo, que se ha unido por enlace covalente por un grupo éster al átomo de carbono 6 de la estructura de anillo fenantrénico de la molécula de la morfina, como se muestra en la fórmula siguiente:



30
35
Además de la formulación sintética y estructural, los procedimientos de purificación, y las utilidades terapéuticas de la invención dada a conocer de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína, se dan a conocer también procedimientos complementarios de síntesis y purificación de otra formulación estructural de esta vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Esta formulación estructural adicional de una vacuna contra la morfina y la heroína consiste en la síntesis alternativa de un producto derivado de EDC-3-O-carboximetilmorfina, utilizando los mismos protocolos y procedimientos de síntesis publicados anteriormente en la bibliografía (S. Spector y C. W. Parker, *Science*, 168:1347, 1970; S. J. Spector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 178:253, 1971; H. Van Vunakis *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 180:514, 1972 y S. Gross *et al.*, *Immunochemistry* 11:453-456, 1974). Este derivado de la EDC-3-O-carboximetilmorfina se unió también por enlace covalente al conjugado vacuna antitetánica-TFCS según los procedimientos de síntesis utilizados para sintetizar la formulación estructural de la vacuna bivalente contra la morfina y la heroína en la presente invención, utilizando el siguiente procedimiento de síntesis:



Este modelo alternativo de la vacuna bivalente contra la morfina y la heroína presenta una estructura de brazo espaciador-enlazador diferente con un tamaño molecular total de 16,47 Å, donde el segmento de la derecha de 9,03 Å comprende la cadena principal hidrocarbonada introducida por el reactivo TFCS, unida por un enlace covalente amídico al resto EDC-3-O-carboximetil en la estructura del anillo fenantrénico de la molécula de morfina. El segmento de la izquierda de 7,44 Å comprende el átomo de carbono α y los cuatro átomos de carbono de la cadena lateral de los restos de lisina de la vacuna antitetánica, que se han unido por enlace covalente mediante el grupo ϵ -amino al segmento del extremo izquierdo del reactivo TFCS, como se muestra en la siguiente fórmula:



Adyuvantes

A pesar del alto peso molecular y la multiplicidad de epítopos inmunógenos presentados por los inmunocombinados que contienen haptenos unidos por enlace covalente con poca complejidad estructural, como se muestra en el nuevo modelo de vacuna de la invención contra la adicción a la morfina y heroína, su administración a un individuo requiere el complemento de compuestos adyuvantes, conocidos por la fuerza de la respuesta inmunitaria inicial (E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, págs. 96-97, 1988). En este sentido, los adyuvantes tienen capacidad para provocar una potente respuesta inmunitaria humoral y/o celular a tipos grandes de antígenos que incluyen, hidratos de carbono, péptidos y proteínas. Por lo tanto, varias formulaciones de adyuvantes químicos se han utilizado y validado en protocolos de vacunación activa en especies animales, que incluyen formulaciones disponibles en el mercado, tales como emulsiones de aceite-agua que pueden o no contener *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por exposición al calor (Sigma-Aldrich), RIBI (RIBI Immunochem Research, Inc.), además de otras formulaciones que contienen polímeros biodegradables y liposomas (véase la reseña en J. Kohn *et al.*, *J. Immunol. Methods*, vol. 95, págs. 31-38, 1986).

Después de largas décadas de investigación experimental, los muy pocos coadyuvantes autorizados y aprobados utilizados para la vacunación humana comprendían formulaciones que contienen hidróxido de aluminio. La preparación de una composición farmacéutica o formulación terapéutica que incluye la "vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y heroína" en la presente invención puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar manejadas por expertos en este campo, junto con cualquiera de los vehículos, excipientes auxiliares y/o farmacéuticos aceptados, descritos en la técnica, incluyendo, diferentes sustancias adyuvantes. Una formulación de dosificación típica de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína y adyuvante utilizado para protocolos de vacunación activa tanto en animales como en seres humanos, consiste en la preparación de una relación mixta de 1:2 (v:v) de la vacuna bivalente:hidróxido de aluminio al mezclar 1 ml de la vacuna en suspensión en H₂O desionizada estéril; con 2 ml de una solución madre de 45 mg/ml de hidróxido de aluminio (Imject-R-Alum, Pierce) añadida por goteo lento (en no menos de 3 minutos). La mezcla de los reactivos se incubaba con agitación lenta y constante durante 1-2 horas a temperatura ambiente. La concentración final de hidróxido de aluminio no debe exceder de 1,12 a 2,25 mg/100 µl en la reacción durante el proceso de mezcla con la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Una vez la mezcla se ha agitado completamente, la formulación de la vacuna bivalente contra la morfina y la heroína/adyuvante de hidróxido de aluminio debe cargarse en jeringas de plástico estériles, utilizando la vía parenteral (es decir, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal) como vías de administración preferentes para introducir la formulación de la vacuna en el anfitrión, con la excepción de la vía intravenosa.

Otros adyuvantes inmunógenos disponibles que pueden combinarse y administrarse con la presente invención de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína incluye un gran grupo de compuestos, tales como fosfato de aluminio, interferones, interleucinas, ésteres de ácido poliláctico, copolímeros biodegradables consistentes en ésteres de ácido poliglicólico, liposomas, lipopolisacáridos de membranas bacterianas, mucopéptidos bacterianos y RIBI. Estas formulaciones y/o composiciones adoptan las formas farmacéuticas de soluciones inyectadas, suspensiones, polvos y compuestos similares.

Inmunización activa

La vía intramuscular es la vía parenteral preferida por medio de la cual la presente invención de la vacuna bivalente contra la morfina y la heroína mezclada con el hidróxido de aluminio adyuvante debe administrarse a los individuos, aunque, para protocolos de vacunación pueden utilizarse otras rutas parenterales, tales como la subcutánea e intraperitoneal. La presente invención de vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína, la composición farmacéutica o la formulación terapéutica que contiene esta preparación de vacuna inmunógena, se debe administrar utilizando una dosis terapéuticamente eficaz y un protocolo/régimen de administración de dosis fijado solamente en el individuo en abstención y desintoxicado de su comportamiento adictivo anterior a la morfina y/o heroína. Este protocolo siempre debe ajustarse según el grado tanto de queja como de adicción del individuo. Un programa típico de la inmunización activa utiliza la vía intramuscular para inocular esta formulación de vacuna en una dosis unitaria del conjugado fármaco hapténico-proteína portadora de hasta 1-2 mg/kg de peso corporal individual (es decir, ratas macho de 250-350 mg de peso, variedad Wistar o Sprague-Dawley). Esta inoculación de cebado debe ser posteriormente seguida de 3 a 6 períodos de refuerzo, administrados a intervalos de 14 días, mediante la administración de la misma dosis unitaria de esta formulación de la vacuna durante el refuerzo. La inmunización activa en los individuos de referencia se lleva a cabo sólo con adyuvante (hidróxido de aluminio) o con adyuvante más proteína transportadora (hidróxido de aluminio + vacuna antitetánica). El suero extraído de individuos vacunados debería muestrearse 10 a 12 días después de cada refuerzo utilizando protocolos y procedimientos estándar anteriormente publicados (E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988) para controlar la respuesta inmunitaria humoral contra la morfina y la heroína, incluyendo a sus metabolitos endógenos. Para conseguir estas condiciones experimentales, se extrajo sangre (100 µl/animal) de diferentes animales experimentales vacunados y se obtuvieron las fracciones de suero, después las muestras recogidas se sometieron a la coagulación de la sangre durante 24 horas a 4°C, seguido de centrifugación del coágulo/fracción sobrenadante a 14.000 x g. Las fracciones de suero obtenidas se congelaron inmediatamente a 20°C hasta su uso.

Se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos ELISA de captura de anticuerpos para identificar y controlar la respuesta inmunitaria humoral contra ambas sustancias opioideas, después de cada refuerzo, según el procedimiento de inmunización activa descrito anteriormente. Estos resultados permitieron apoyar la eficacia de la nueva vacuna contra la morfina y la heroína de la invención para provocar una fuerte respuesta inmunitaria humoral frente a estos compuestos opioideos. Por otra parte, estos resultados condujeron a la identificación del número de refuerzos requeridos para provocar una respuesta humoral con concentraciones máxima y estable de anticuerpos séricos contra estas sustancias opioideas. En total, se utilizaron estos datos experimentales para seleccionar y definir animales hiperinmunes experimentales que fueron posteriormente expuestos al protocolo de inmunoprotección frente a estas sustancias opioideas utilizando el modelo de comportamiento de ratas del modelo de autoadministración intravenosa de opioideos adictivos (véase más abajo las figuras 6 y 7).

Se utiliza un procedimiento inmunoenzimático típico de ensayo de ELISA de captura de anticuerpos para controlar la respuesta inmunitaria humoral contra la morfina y la heroína a partir del suero de individuos vacunados activamente

con la formulación de la vacuna terapéutica antimorfina y heroína de la invención que consiste en la síntesis inicial de la fase sólida del ensayo aumentando la adsorción de 3-4 µg de la preparación antigénica de morfina-6-hemisuccinil-BSA/pocillo en placas de 96 pocillos (Inmunolon I, Corning). Los capturados de los anticuerpos contra morfina/contraheroína por la fracción antigénica absorbidos sobre la fase sólida se lleva a cabo después de un período de incubación de 6 h a temperatura ambiente de alícuotas (50 µl/pocillo) que contiene una dilución en serie progresiva de los anticuerpos obtenidos a partir animales inmunizados (es decir, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y 1:1.000.000). Después, los pocillos se lavaron exhaustivamente con una solución que contiene 1% de BSA/0,3% de Tween-20/PBS, pH 7,4, seguido de un período de incubación de 2 a 3 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de rata anti-IgG (H+L) (Vector Laboratories) conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de este período de incubación, los pocillos se lavaron exhaustivamente para eliminar el exceso del anticuerpo secundario no unido, seguido de la detección de señales inmunopositivas/pocillo utilizando un sustrato cromogénico (OPD, SIGMA). Los pocillos ensayados están expuestos a la detección espectrométrica de los valores de absorbancia a 490 nm de la fracción de anticuerpo capturada por la fase sólida antigénica utilizando un sistema detector ELISA de microplaca. Los valores de absorbancia espectrométrica obtenidos reflejan la cantidad de anticuerpo capturado por la fase sólida antigénica. Por lo tanto, los valores de anticuerpos finales se estiman y expresan como el valor inverso de la fracción diluida de antiseros probados que da 50% de la respuesta de absorbancia máxima, utilizando los procedimientos de normalización por ordenador.

La figura 1 muestra un resultado representativo de un ensayo ELISA de captura de anticuerpos utilizado para identificar inicialmente la eficacia de la nueva vacuna bivalente de la invención contra la adicción a la morfina y la heroína para provocar una respuesta inmunitaria humoral con altos valores de anticuerpos (es decir, que produce un valor medio de $\approx 1:100.000$) contra la morfina, poco después del segundo refuerzo en un grupo de 10 animales inmunizados muestreados. Como se muestra en la figura, la concentración de anticuerpos reactivos detectados por su absorbancia a 490 nm en el ensayo disminuye proporcionalmente a la dilución en serie de los antiseros.

La figura 2 representa un resultado representativo de un ensayo ELISA de captura de anticuerpos para hacer el seguimiento a lo largo del tiempo de los valores séricos de anticuerpos para la morfina y la heroína después del refuerzo a animales (1 a 7 refuerzos) periódicamente con el preparado de vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína. Después de cebar las ratas (primera inoculación) con esta nueva formulación terapéutica de la vacuna bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína, los valores de anticuerpos séricos contra estas sustancias opioideas se controlaron 10 a 12 días después de cada refuerzo (de 4 a 7). Como se muestra en la figura, se obtuvo un aumento progresivo en la concentración de anticuerpos contra estas sustancias opioideas hasta el cuarto período de revacunación, donde 10 animales vacunados activamente presentaron valores medios que oscilan entre 1:800.000 y 1:1.000.000. Sin embargo, las revacunaciones posteriores con el inmunógeno de la morfina y la heroína (desde la 5ª a la 7ª) no fueron eficaces en la producción de valores de anticuerpos significativos crecientes en animales considerados hiperinmunes a estos fármacos opioideos (datos no mostrados en la figura). Este último resultado supone la utilización de protocolos de inmunización activa de corta duración con la nueva formulación de la vacuna contra la morfina y la heroína terapéutica para alcanzar una respuesta inmunitaria humoral máxima contra ambas sustancias opioideas.

Uno de los objetivos centrales que debe alcanzar cada nuevo modelo de vacunas terapéuticas cuando se utiliza en protocolos de inmunización activa, es su capacidad para provocar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular fuerte y estable a lo largo del tiempo establecida con memoria inmunitaria de larga duración. En este sentido, la figura 3 es un diagrama de datos representativos que muestran una disminución temporal de la respuesta inmunitaria humoral de anticuerpos contra la morfina y la heroína vista después de la cuarta revacunación en individuos vacunados activamente ($n = 10$) con la nueva formulación de la vacuna terapéutica. Es de destacar el hecho de que los animales hiperinmunes sin dosis de refuerzo, presentan una disminución progresiva con el tiempo de los valores de anticuerpos a lo largo de un período de 120 días. El valor inicial de anticuerpos obtenido después de la última revacunación (que dio un promedio entre 1:800.000 y 1:1000.000) presentó una disminución significativa de alrededor de 40 a 50 veces, alcanzando un valor mínimo medio de 1:20.000 al final de este período. Estos datos demuestran y apoyan la hipótesis de que la inmunización activa con la nueva formulación de la vacuna contra la morfina y la heroína terapéutica puede provocar una respuesta inmunitaria humoral clásica alcanzando valores de anticuerpos estables, al menos después de la cuarta revacunación. Esta prueba está fuertemente apoyada por los datos experimentales obtenidos en el ELISA de captura de anticuerpos como se representa en la figura 4, que demuestra que una respuesta de memoria inmunitaria a largo plazo contra estas dos sustancias opioideas se ha creado después del cuarto refuerzo. Esta figura muestra los valores medios de los valores de anticuerpos séricos de diez individuos experimentales expuestos a un refuerzo posterior con la vacuna bivalente después de completar un período sin refuerzo de larga duración de seis meses desde la última revacunación (4ª). Como se muestra en la figura, la revacunación activa con la presente invención de la formulación de la vacuna contra la morfina y la heroína terapéutica provocó una rápida y estable recuperación de los niveles máximos preexistentes de los valores de anticuerpos contra estas sustancias opioideas (es decir, generalmente dentro de los primeros 5 a 10 días después del refuerzo) en animales hiperinmunes no revacunados. Vale la pena señalar la disminución similar con el tiempo de los valores de anticuerpos mostrada después del cuarto refuerzo (véase la figura 3) en animales hiperinmunes no vacunados (es decir, una vez sometidos los animales a la prueba de provocación con el último refuerzo de la vacuna contra, se alcanzaron niveles máximos de valoración 15 a 20 días después refuerzo, seguido de una lenta y progresiva disminución lineal durante los próximos 30 días, llegando a los niveles más bajos de los valores de

anticuerpos detectados hasta 120 días, datos no representados en el la figura).

Una vez evaluada y validada la eficacia de la nueva formulación terapéutica de la invención de una vacuna contra la morfina y la heroína en protocolos de vacunación activa, mostrando su capacidad para generar una respuesta inmunitaria humoral fuerte caracterizada por altos y mantenidos valores de anticuerpos séricos contra estas sustancias opioideas, se diseñaron y desarrollaron ensayos ELISA competitivos inmunoenzimáticos adicionales para evaluar e identificar la especificidad de los anticuerpos contra la morfina y la heroína.

Este ensayo ELISA competitivo utilizado para evaluar la especificidad de los anticuerpos se basa en el mismo diseño experimental utilizado para los no competitivos ensayos ELISA mencionados anteriormente. La diferencia con respecto a los ensayos ELISA competitivos consiste en una etapa de preadsorción de los antiseros específicos de animales hiperinmunes que utilizan diferente concentración (es decir, que varían en el intervalo nM- μ M) de potenciales antígenos competitivos potencialmente reconocidos por los anticuerpos contra morfina. Estos antígenos competitivos incluida la morfina como sustancia de referencia positiva, además de los tres principales metabolitos endógenos de la morfina y la heroína (por ejemplo, 6-monoacetilmorfina, morfina-3-glucurónido y morfina-6-glucurónido) que se ha demostrado que presentan propiedades de refuerzo de los opioides, y heroína, como análogo estructural sintético de la morfina, que se ha demostrado que presentan por lo menos un orden de magnitud superior en sus propiedades de refuerzo de opioides en dosis equivalentes, que su ortólogo opioide natural, la morfina. Otros dos péptidos opioideos endógenos representativos producidos en el SNC de los mamíferos, tales como la leucina-enkefalina y la β -endorfina, también se incluyeron como antígenos competitivos en este ensayo. Además, este ensayo también incluía compuestos farmacológicos antagonistas competitivos activos para los receptores de opioides, tal como la naltrexona, sustancia utilizada frecuentemente en el mantenimiento de los la abstinencia en la adicción a la heroína en los seres humanos.

Ya que este ensayo se basa en la detección de señales positivas originadas a partir de la absorbancia emitida desde los pocillos que reaccionan cuando se exponen al sistema de detector ELISA de microplacas a 490 nm, los pocillos que presentan una ausencia de señales significativas a esta longitud de onda (490 nm) sugieren la falta de anticuerpos específicos capturados por los antígenos adsorbidos en la fase sólida (que en el caso de la invención era el conjugado morfina-6-hemisuccinil-BSA). Si se producen, esta última condición experimental indicaría que los anticuerpos séricos generados por la vacunación activa con la nueva formulación de la vacuna contra la morfina y la heroína de la invención presentaría potencial reconocimiento cruzado para algunos de los antígenos competitivos utilizados en el ensayo.

Los datos representativos representados en la figura 5 ilustran un ensayo ELISA inmunoenzimático competitivo, que muestra la especificidad equivalente de los anticuerpos séricos para el reconocimiento cruzado de la morfina y la heroína (téngase en cuenta que ambas curvas de competencia muestran dosis de morfina y heroína competitivas similares comprendidas en el intervalo de hasta 0,6-0,8 μ M a los valores de referencia de CI_{50}). Además, estos ensayos también muestran la capacidad de dichos anticuerpos séricos contra la morfina y la heroína de reconocimiento cruzado diferentes metabolitos de biotransformación de estas sustancias opioideas (es decir, 6-monoacetil-morfina, morfina-3-glucurónido y morfina-6-glucurónido). Además, no se observó en los mismos ensayos reconocimiento cruzado de otras sustancias tales como péptidos opioideos endógenos y el antagonista de receptores opioideos naltrexona. En conjunto, estos resultados permiten proponer la potencial falta de interferencia inmunológica de este inmunógeno en protocolos de vacunación activa cuando podría utilizarse en las personas tratadas con tratamientos antiadictivos clásicos que utilizan medicamentos opioideos con estructuras diferentes de la morfina tales como naltrexona, naloxona, metadona y buprenorfina. Por otra parte, se puede suponer que la nueva formulación de la invención de la vacuna terapéutica contra la adicción a la morfina y la heroína no puede generar una respuesta autoinmunitaria, debido a que los anticuerpos generados por esta vacuna no pueden reconocer péptidos opioideos endógenos (es decir, leucina-enkefalina y β -endorfina) que además de ser sintetizados en el cerebro en los animales hiperinmunes vacunados incluyendo los seres humanos, participan en la regulación de una variedad múltiple de actividades fisiológicas y de tratamiento de una amplia gama de funciones cerebrales en el SNC de los mamíferos.

Evaluación y validación de la eficacia de la presente invención de la formulación de la vacuna bivalente terapéutica contra la adicción a la morfina y la heroína

Después de mostrar la validación de la eficacia de la presente formulación de la vacuna terapéutica bivalente contra la morfina y la heroína para conferir hiperinmunidad contra la morfina y la heroína con una respuesta mejorada de la memoria inmunitaria de larga duración, mediante la generación de valores séricos altos y mantenidos de anticuerpos específicos que reaccionan contra estas drogas opioideas y sus metabolitos endógenos en individuos inmunizados, los inventores decidieron explorar los efectos inmunoprotectores de la presente formulación de la vacuna terapéutica contra la readquisición del comportamiento del consumo adictivo en animales hiperinmunes desintoxicados y en abstinencia de la adicción a estos opioides. En este sentido, animales hiperinmunes probados contra morfina y/o heroína se expusieron a pruebas de comportamiento operante utilizando el modelo de autoadministración de fármacos por vía intravenosa tanto para la morfina como para la heroína. Estos modelos farmacológicos utilizados en el modelo animal de la rata se llevaron a cabo en modelos farmacológicos relacionados previamente publicados por varios grupos de investigación (J. M. van Ree *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 204 (3): 547-557, 1978; J. M. van Ree

y D. de Wied, *Life Sci.* 21:315-320, 1977; T. J. Martin *et al.*, *J. Pharmacol Exp. Ther.* 272:1135-1140, 1995, P. Hyttiä *et al.*, *Psychopharmacology*, 125:248-254, 1996. T. J. Martin *et al.*, *Brain Res.* 755: 313, 318, 1997, C. W. Hutto, Jr. y W. F. Crowder, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (1):133-140, 1997; R. Ranaldi y E. Munn, *Neuroreport*, 9:2463-2466, 1998; S. Martin *et al.*, *Brain Res.* 821:350-355, 1999; I. M. Maisonneuve y S. D. Glick, *Eur. J. Pharmacol.*, 383:15-21, 1999. S. D. Comer *et al.*, *Psychopharmacology*, 143327-338, 1999; S. Semenova *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 378:1-8, 1999; M.R.A. Carrera *et al.*, *Psychopharmacology*, 144:111-120, 1999; Z-X. Xi y E. A. Stein, *J. Pharm. Exp. Ther.* 290:1369-1374, 1999 y L. J. Sim-Selley *et al.*, *J. Neurosci.* 20 (12):4555-4562, 2000).

Los modelos farmacológicos de los modelos de autoadministración intravenosa de morfina y heroína en los roedores se han utilizado ampliamente para explorar los mecanismos neurobiológicos por los cuales estos opioides producían sus propiedades reforzadoras de drogas. Además, estos modelos se han utilizado también para evaluar los efectos antiadictivos de los compuestos terapéuticos, tales como metadona, naloxona y naltrexona. Por otra parte, estos modelos farmacológicos son sumamente útiles para evaluar las respuestas de motivación y reforzadoras de las drogas, independientemente de la efectos farmacológicos directos producidos por estos fármacos opioides en el sistema nervioso (es decir, la activación psicomotora) cuando se emplean protocolos apropiados durante la autoadministración farmacológica de estas sustancias. Por lo tanto, a fin de evaluar y validar los efectos inmunoprotectores contra la adicción a la morfina y la heroína conferidos por la presente invención de la formulación de la vacuna contra la morfina y la heroína bivalente terapéutica, el laboratorio de los inventores ha diseñado, desarrollado y validado un modelo de autoadministración de fármacos por vía intravenosa para estas dos sustancias opioides en el modelo animal de la rata.

a).- Desarrollo, aplicación y validación del modelo de autoadministración intravenosa de morfina y heroína en el modelo animal de la rata

El modelo farmacológico del modelo de autoadministración de morfina y/o heroína por vía intravenosa en la rata se normalizó en varios protocolos previamente publicados por diferentes grupos (J. M. Van Ree *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 204 (3):547-557, 1978; J. M. Van Ree y D. of Wied, *Life Sci.* 21:315-320, 1977; T. J. Martin *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272:1135-1140, 1995; P. Hyttiä *et al.*, *Psychopharmacology*, 125:248-254, 1996; T. J. Martin *et al.*, *Brain Res.* 755:313-318, 1997; C. W. Hutto, Jr. y W. F. Crowder, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58(1):133-140, 1997; R. Ranaldi y E. Munn, *Neuroreport*, 9:2463-2466, 1998; S. Martin *et al.*, *Brain Res.* 821:350-355, 1999; I. M. Maisonneuve y S. D. Glick, *Eur. J. Pharmacol.*, 383:15-21, 1999; S. D. Comer *et al.*, *Psychopharmacology*, 143327-338, 1999; S. Semenova *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 378:1-8, 1999; M. R. A. Carrera *et al.*, *Psychopharmacology*, 144:111-120, 1999; Z-X. Xi y E. A. Stein, *J. Pharm. Exp. Ther.* 290:1369-1374, 1999 y L. J. Sim-Selley *et al.*, *J. Neurosci.* 20(12):4555-4562, 2000). Básicamente, este modelo farmacológico consiste en la utilización de animales implantados quirúrgicamente con catéteres estériles de teflón colocados en la vena yugular externa derecha o izquierda para modelos de autoadministración intravenosa de opioides utilizando la morfina y la heroína como drogas reforzadoras, durante sesiones de 4h/día, dentro de jaulas de Skinner de condicionamiento operante, controladas por el observador utilizando señales computarizadas. En este sentido, la infusión intravenosa de una "dosis unitaria" completa de cada una de estas dos sustancias opioides se establece por el número fijo de respuestas palanca operantes hechas por el animal sobre una palanca retráctil (colocado en el panel frontal de las jaulas de Skinner) a intervalos de tiempo especificados. Por ejemplo, la infusión de una dosis unidad de la morfina (es decir, 1900 µg/0,2 ml/kg de peso) y heroína (60 µg/0,2 ml/kg) se lleva a cabo cuando el animal se completa un número fijo de respuestas de palanca (es decir, 1, 3, 5, 10) después de intervalos de tiempo definidos (es decir, 20, 40, 80 segundos), tiempo en el que la palanca retráctil está inactiva. Por lo tanto, en estas condiciones farmacológicas, se puede evaluar las respuestas de comportamiento de consumo de drogas, estimando en las sesiones de 4 horas/día el número total de infusiones de opioides realizados por el animal. También se incluyen en el análisis las mediciones de las respuestas al comportamiento de búsqueda de drogas estimando el número total de retracciones de palanca que ocurren en los intervalos de tiempo, cuando la palanca retráctil está inhabilitada. En estas condiciones experimentales, los animales adiestrados fijaron la cantidad de fármaco opioideo que necesitan administrarse. Hasta el momento, este modelo farmacológico permite llevar a cabo los procedimientos cuantitativos y reproducibles utilizados para estimar las dosis acumuladas de droga/animal/sesión/día autoadministrada por vía intravenosa, incluyendo las dosis acumuladas de droga/animal autoadministradas en todo el programa de adiestramiento (es decir, los datos acumulados durante 15, 30, 60 días). La capacidad de la morfina y la heroína para provocar una respuesta de comportamiento operante (es decir, la manipulación de la palanca retráctil para producir un comportamiento y/o comportamientos de búsqueda de drogas) se define como las propiedades de refuerzo de cada fármaco para discriminar el estímulo asociada al fármaco. En este sentido, animales hiperinmunes vacunados con la vacuna bivalente de la presente invención, con respuestas inmunitarias humorales de valores de valores altos y mantenidos de anticuerpos séricos contra la morfina y la heroína, deberían mitigar o neutralizar las propiedades de refuerzo de fármacos provocadas por estas sustancias opioides en el cerebro, ante se someten a la prueba de provocación para adquirir el comportamiento adictivo de autoadministración de morfina o heroína por vía intravenosa. Estos animales deben mostrar una disminución significativa de respuestas de comportamiento de consumo de drogas y búsqueda de drogas debido a la ausencia de estímulos asociados a drogas de refuerzo.

En resumen, este modelo farmacológico basado en el modelo de autoadministración de opioideos por vía intravenosa, permitió a los inventores obtener y construir valores de referencia del comportamiento operante de consumo de drogas en los animales que consolidaron respuestas adictivas tanto a la morfina como a la heroína. El

parámetro farmacológico relativo a las respuestas del comportamiento de consumo de opioides tanto a la morfina como a la heroína se obtuvieron después de comparar las tasas de autoinfusión de estos fármacos en animales hiperinmunes inmunizados con la formulación de la vacuna bivalente terapéutica contra la morfina y la heroína de la presente invención y los grupos de referencia (no inmunizados o inmunizados solamente con adyuvante y adyuvante más proteína portadora, véanse los resultados representativos en las figuras 6 y 7).

1. El desarrollo funcional e implantación de las jaulas operantes de Skinner.

La instalación y el funcionamiento de ocho jaulas operantes de Skinner (aluminio y acrílico transparente) diseñadas para autoadministración intravenosa de líquidos y fármacos en el modelo animal de rata se desarrollaron según las normas de funcionamiento recomendadas por el fabricante (Sistemas de condicionamiento operante del comportamiento para animales de laboratorio, TSE Systems, Hamburgo, Alemania).

2.- Desarrollo de modelos de adiestramiento para aprendizaje por condicionamiento para pulsar la palanca y obtener alimentos como recompensa

Se adiestraron ratas Wistar macho (260-320 g) para localizar y presionar palancas retráctiles dentro de jaulas operantes de Skinner, y para cada pulsación de la palanca, se recompensaba a los animales con un máximo de 200 bolitas de alimento (45 mg) (Noyes Traditional Food Precision Pellets; Research Diets, Inc., Lancaster, NH) durante 5 a 7 días en sesiones de adiestramiento de 4h. En estas condiciones experimentales, los animales estaban condicionados a obtener alimentos como recompensa (refuerzo del estímulo) cada vez que los animales presionan la palanca retráctil [protocolo de refuerzo fijo 1 (FR1)], tras la exposición de un estímulo de luz indirecta (estímulo condicionado), controlada en línea por programa informático (TSE, OBS system) durante sesiones diarias de 4 h durante un período de 5 a 7 días. Después de este período de adiestramiento, la duración de las sesiones se redujeron a 30 minutos, aumentando los intervalos de tiempo de espera de 5 (TO-5) a 20 s (TO-20), momento en el que se inhabilitaron las palancas retráctiles durante los siguientes 3 a 5 días. Por lo tanto, se adiestraron animales para completar sus respuestas a la palanca al obtener solamente 50 bolitas en un programa de refuerzo fijo (FR1, TO-20 s) en sesiones diarias de 30 minutos. Los animales sucesivos en este adiestramiento de condicionamiento del comportamiento, fueron devueltos a sus jaulas individuales, bajo dieta restringida (16 a 20 g bolitas de comida/día), y posteriormente se expusieron a la implantación quirúrgica de catéteres intravenosos de teflón en la vena yugular externa, a fin de iniciar los procedimientos experimentales de inmunoprotección contra la adicción de morfina y/o heroína cuando se exponen a los modelos de autoadministración de opioides por vía intravenosa.

3. Implantación quirúrgica de catéteres estériles en las venas yugulares externas.

Animales experimentales adiestrados para pulsar la palanca y obtener alimento como recompensa, utilizando el comportamiento de condicionamiento operante descritos anteriormente, se sometieron a anestesia general y condiciones asépticas quirúrgicas para la implantación quirúrgica de catéteres intravenosos de teflón dentro de las venas yugulares externas derecha o izquierda. El procedimiento quirúrgico completo se realizó según los protocolos quirúrgicos estándar descritos por K. M. Kantak *et al.* (*Psychopharmacology*, 148:251-262, 2000). Tras la cirugía, los animales se devolvieron a sus jaulas de origen y comprobó la viabilidad funcional de los catéteres implantados en un día mediante la infusión de solución salina y antibióticos [Enrofloxacin al 5% (0,50 mg/kg); gentamicina-Super 5mg/kg). Después de siete días de recuperación posquirúrgica, los animales se sometieron a continuación a los modelos farmacológicos de autoadministración intravenosa tanto de morfina como de heroína.

4. Desarrollo y creación de valor de referencia de respuestas de morfina y heroína autoadministradas por vía intravenosa.

Se verificó la viabilidad funcional de los catéteres implantados en animales recuperados después de la intervención quirúrgica, antes de exponer los animales a sesiones diarias de 4 horas del modelo de autoadministración intravenosa de morfina y heroína. Inicialmente, se expusieron grupos independientes de animales a la autoadministración aleatoria de una dosis unitaria fija de morfina (1900 µg/kg/0,2 ml de solución salina) durante 10 segundos de inyección) o de heroína (60 µg/kg/0,2 ml de solución salina/10 segundos de inyección) siguiendo un programa de refuerzo fijado (FR1) TO-20 segundos, durante sesiones diarias de 4 horas durante 5 a 7 días consecutivos. La diferencia de estos valores de dosis unitaria de refuerzo entre la morfina y la heroína estaba basada en los datos publicados anteriormente en la bibliografía (J. M. van Ree *et al.*, *J. Phar. Exp. Ther.* 204 (3): 547-557, 1977 y C. W. Hutto, Jr. y W. F. Crowder, *Phar. Biochem. Behav.* 58 (1) :133-140, 1997), que demostró que una relación de proporción de dosis morfina:heroína de 32:1, produce igual elección en la autoinfusión de estas sustancias opioideas cuando son autoadministradas por las ratas en estas condiciones experimentales. Este periodo de adiestramiento condujo a los animales a adquirir respuestas de referencia estables en la autoadministración contingente de estos opioides, durante un periodo de adiestramiento adicional de 7 a 10 días. En estas condiciones de protocolo, los animales adiestrados produjeron respuestas de la infusión con valor de referencia medio de 25 ± 3 y 20 ± 5 durante la autoadministración de las dosis unitarias fijadas tanto de heroína como de morfina, respectivamente. Las respuestas de la autoinfusión con valor de referencia a estas dos drogas se consideraban probadas y consolidadas cuando los valores del coeficiente de variabilidad variaban no más del 10% para cada fármaco a lo largo de las sesiones de autoinfusión, durante al menos cinco días consecutivos experimentales. Una

vez alcanzadas las respuestas de la autoinfusión basales con valor de referencia inicial tanto a la morfina como a la heroína, la fase inicial de extinción se llevó a cabo sustituyendo las sustancias opioideas por solución del vehículo (es decir, solución de vehículo = solución salina de NaCl al 0,9% en H₂O desionizada estéril) durante los 3 a 5 días siguientes, justo después de probarse las respuestas de autoinfusión a ambos opioides. Las respuestas de la extinción a la autoinfusión tanto de la morfina como de la heroína alcanzadas por los animales implantados quirúrgicamente se definieron después de alcanzar un número promedio medio de las respuestas de extinción/sesión/día de 3 ± 2 a la solución de vehículo autoadministrada, en los grupos de animales adiestrados para autoadministrarse ya sea morfina o heroína que consolidó una fase inicial de las respuestas con valor de referencia como se mencionó anteriormente. Para consolidar las respuestas de comportamiento de autoadministración de opioides, tanto a la morfina como a la heroína, se realizaron dos ciclos de readquisición-extinción posteriores de autoadministración de opioides. En este contexto experimental, quince días después de obtener las respuestas de valores de referencia promedio de la fase de extinción al modelo de autoadministración de opioides, los inventores evaluaron el efecto del antagonismo de los anticuerpos séricos contra la morfina y la heroína sobre la readquisición de las respuestas al comportamiento adictivo de autoinfusión a ambas sustancias opioides en animales hiperinmunes (adiestrados para autoadministrarse estas sustancias opioides) después de haber sido inmunizados activamente con la formulación de vacuna bivalente terapéutica contra la adicción a la morfina y heroína, utilizando el protocolo de vacunación/inmunización descrito en la presente invención.

5. Caracterización del efecto inmunoprotector contra la adicción a la morfina y la heroína provocado por la inmunización activa con la vacuna contra la morfina y la heroína de la presente invención

Diferentes grupos de animales adiestrados a autoadministrarse morfina y heroína, que demostraron autoinfusiones con valor de referencia de estas drogas opioides se vacunaron activamente, ya sea con la formulación de la vacuna bivalente terapéutica contra morfina y heroína de la presente invención o con compuestos de referencia (es decir, hidróxido de aluminio se utiliza como coadyuvante y este coadyuvante más toxoide tetánico se utiliza como proteína portadora) siguiendo el mismo protocolo de inmunización descrito en la presente invención. Una vez demostrada la respuesta inmunitaria humoral contra estos dos fármacos (véanse las figuras 1, 2, 3 y 4) en animales hiperinmunes vacunados, éstos se volvieron a exponer a continuación al modelo de autoadministración intravenosa tanto con morfina como con heroína, a fin de evaluar las respuestas inmunoprotectoras contra estos fármacos opioides midiendo el número de respuestas de autoinfusión completas (comportamiento por consumo de drogas) a lo largo de 15 a 20 sesiones consecutivas de 4 horas al día. Los mismos estudios se llevaron a cabo en los grupos de animales de referencia, que recibieron el adyuvante ya sea solo o el adyuvante más la proteína portadora.

Los datos obtenidos se expresaron como la media aritmética de número acumulado de respuestas completas autoinfusión/día/en el grupo experimental vacunado durante 15 a 20 sesiones diarias, y se ensayaron para evaluar el efecto inmunoprotector. El análisis estadístico de los datos se realizó por análisis de variancia (ANOVA), seguido de una prueba de Newman-Keuls para el análisis de comparación *post-hoc*.

En este contexto experimental, grupos de prueba incluían, animales hiperinmunes contra la morfina y la heroína (CP-MORFINA, n = 8) y grupos de referencia inmunizados con adyuvante de hidróxido de aluminio (ALUMBRE, n = 8) o con la proteína portadora más adyuvante (CP + ALUMBRE, n = 8). Todos ellos recibieron la misma dosis unitaria de la heroína o la morfina durante el modelo de autoadministración intravenosa como se expuso anteriormente en la presente invención. Los resultados que muestran las respuestas (valores) al valor de referencia medio del número de autoinfusiones conseguidos para cada sustancia opioide autoadministrada, así como el vehículo de referencia autoadministrado (es decir, solución salina) a lo largo de 15 a 20 sesiones consecutivas, 4 horas diarias, se muestran en las figuras 6 y 7.

La figura 6, representa el efecto inmunoprotector provocado por la vacunación activa con la formulación de la vacuna bivalente terapéutica contra la morfina y la heroína de la presente invención contra el comportamiento de autoadministración de morfina por vía intravenosa en el modelo animal de la rata. El grupo de ratas inmunizadas con la vacuna de la presente invención, y los grupos de referencia, inmunizados con adyuvante o con adyuvante más proteína portadora se expusieron al modelo de autoadministración de morfina. Los animales de referencia que recibieron sólo el hidróxido de aluminio (ALUMBRE) como inmunógeno no presentaron cambios significativos con respecto a las respuestas medias de autoinfusión de morfina/sesión (17 ± 4 , S.E.M.) en comparación con las respuestas medias de preinmunización en los animales de referencia (18 ± 5 , S.E.M.). Por el contrario, los animales vacunados con la preparación inmunógena de morfina (CP-morfina) mostraron una reducción significativa en el número medio de autoinfusiones de heroína/sesión (4 ± 3 , S.E.M., $p < 0,005$) en comparación con los animales inmunizados con adyuvante (ALUMBRE) o con adyuvante más portador de proteína (CP sola + ALUMBRE). Vale la pena tener en cuenta el modelo similar de la media aritmética de las respuestas de autoinfusión obtenidas con solución salina (vehículo de referencia) alcanzado por los animales inmunizados con estos tres preparados de vacuna diferentes (3 ± 2 con ALUMBRE, 3 ± 2 con ALUMBRE + CP; y 3 ± 2 con la vacuna bivalente contra morfina y heroína de la presente invención).

La figura 7, representa el efecto inmunoprotector de la vacunación activa con la formulación de la vacuna bivalente terapéutica contra la morfina y la heroína de la presente invención contra el comportamiento de autoadministración intravenosa de heroína en el modelo animal del roedor. El grupo de ratas inmunizadas con la presente vacuna y los

5 grupos de referencia inmunizados con adyuvante y/o con adyuvante más proteína portadora se expusieron a los modelos farmacológicos de autoadministración de heroína. Los animales de referencia que recibieron sólo hidróxido de aluminio (ALUMBRE) como inmunógeno no mostraron diferencias significativas con respecto a la media aritmética de respuestas autoinfusión/sesión de heroína (24 ± 4 , SEM) cuando se compara con las respuestas medias de preinmunización (21 ± 3 , S.E.M.) obtenidas en los animales de referencia. Por el contrario, los animales vacunados con la preparación inmunógena de morfina (CP-morfina) mostraron una reducción significativa en el número promedio de autoinfusiones de heroína/sesión (6 ± 2 , S.E.M., $p < 0,005$) en comparación con los animales inmunizados con adyuvante (ALUMBRE) o con adyuvante más la proteína portadora (CP sola + ALUMBRE). Por otra parte, el número promedio de autoinfusiones de solución salina (vehículo de referencia) alcanzado por los animales inmunizados con estos tres preparados de vacuna (3 ± 2 en el grupo de animales inmunizados con ALUMBRE; 2 ± 3 en el grupo de animales inmunizados con ALUMBRE + CP; y 3 ± 1 en el grupo de animales inmunizados con la vacuna bivalente contra la morfina y la heroína de la presente invención) fueron muy similares.

10

15 Por último, se está evaluando la aplicación de este tipo de estrategias terapéuticas para su futura aplicación en seres humanos que presentan graves problemas de adicción tanto a la morfina como a la heroína.

REIVINDICACIONES

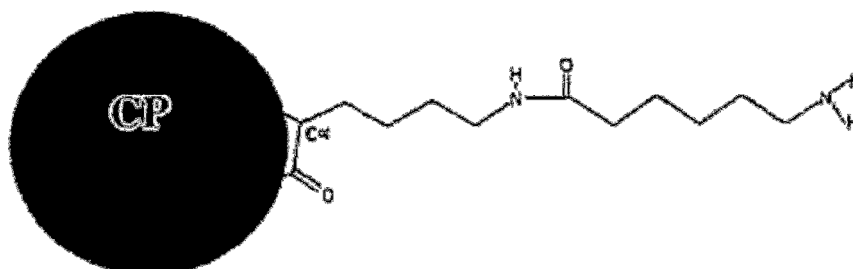
1. Procedimiento para la preparación de una composición inmunógena bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína que implica una reacción entre una proteína portadora ("CP") y un producto morfínico, en el que la proteína portadora es el toxoide tetánico y el producto morfínico es EDC-(morfina-6-hemisuccinato), en el que el producto morfínico está unido a un conjugado intermedio ("CP-TFCS") en la composición, y en el que la composición se prepara según las etapas siguientes:

- a) hacer reaccionar 100 mg (0,5 mM) de toxoide tetánico disuelto en 4 ml de una solución tampón de fosfato/NaCl 0,15 mM, pH 7,2 con 50 μ l de 40 mg/ml de una solución madre de N-(ϵ -trifluoroacetilcaproiloxi)-succinimida-éster ("TFCS") que contiene 10 a 20% de DMSO y 90 a 80% de H₂O desionizada (v:v), para empezar la formación del conjugado intermedio;
- b) obtener una concentración final de toxoide tetánico de 6,7 mM 0,5-1% de DMSO;
- c) obtener una dilución final de 1:10-20 (v:v) de la concentración inicial de DMSO entre el toxoide tetánico y TFCS;
- d) incubar el contenido de la etapa c) durante hasta 60 a 90 minutos a temperatura ambiente, en el que tiene lugar la síntesis de CP-TFCS, y en el que TFCS todavía conserva un grupo amino reactivo protegido por un grupo químico protector trifluoroacetilo;
- e) incubar el CP-TFCS durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente y ajustar el pH a 8-8,5, con una solución de NaOH 10 N concentrada para enriquecer el grupo trifluoroacetilo protegido en TFCS que debe hidrolizarse, a fin de generar grupos amino reactivos libres en el CP-TFCS;
- f) purificar el CP-TFCS utilizando procedimientos de diálisis estándar;
- g) hacer reaccionar el producto morfínico, EDC-(morfina-6-hemisuccinato), con el CP-TFCS, en el que la reacción se lleva a cabo en una proporción estequiométrica haciendo reaccionar mol:mol, 100 μ moles de EDC-(M-6-H) por cada 0,07 μ moles de grupos amino libre activos del CP-TFCS;
- h) incubar los reactantes obtenidos en la etapa g) 2 a 3 horas a temperatura ambiente en agitación lenta y constante para formar la composición inmunógena;
- i) purificar la composición inmunógena utilizando procedimientos de diálisis estándar;
- j) esterilizar la composición inmunógena por procedimientos de filtración a presión positiva utilizando filtros de membrana de 0,45 μ m de tamaño de poro;
- k) liofilizar alícuotas de 1 ml de la composición inmunógena en viales de vidrio estériles sellados al vacío y almacenarlos a 4°C para su conservación.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa f) de purificación del CP-TFCS comprende dializar el CP-TFCS con membranas de diálisis con umbral de 10 kDa de peso molecular durante hasta 24 horas a 4°C frente a tres cambios de 6 litros de solución tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2 cada 8 horas.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa i) de purificación de la composición inmunógena comprende dializar la composición inmunógena con membranas de diálisis con umbral de 10 kDa de peso molecular durante hasta 24 horas a 4°C frente a tres cambios de 6 litros de solución tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,2 cada 8 horas.

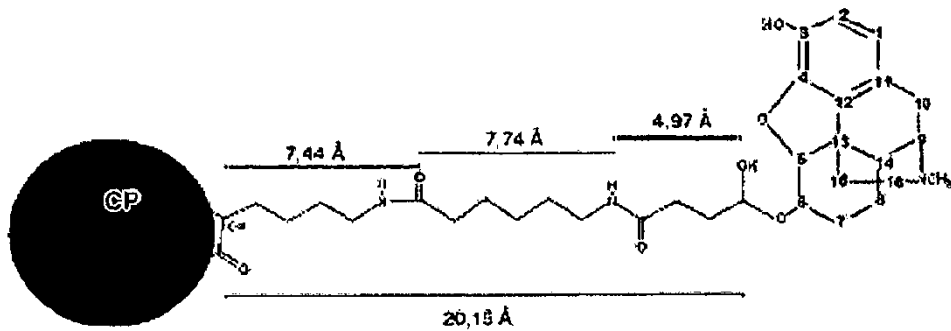
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el CP-TFCS comprende la fórmula estructural siguiente:



5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el toxoide tetánico está unido por enlaces covalentes a través de sus grupos amino épsilon de la cadena lateral de los restos de lisina expuestos en el CP-TFCS.

5 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa g) se obtiene mediante un enlace amídico covalente, formado al hacer reaccionar los grupos imídicos expuestos en el extremo libre de EDC-(M-6-H) y los grupos amino libres no protegidos expuestos del TFCS conjugado procedente del CP-TFCS.

10 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición inmunógena presenta la estructura representada en la fórmula siguiente:

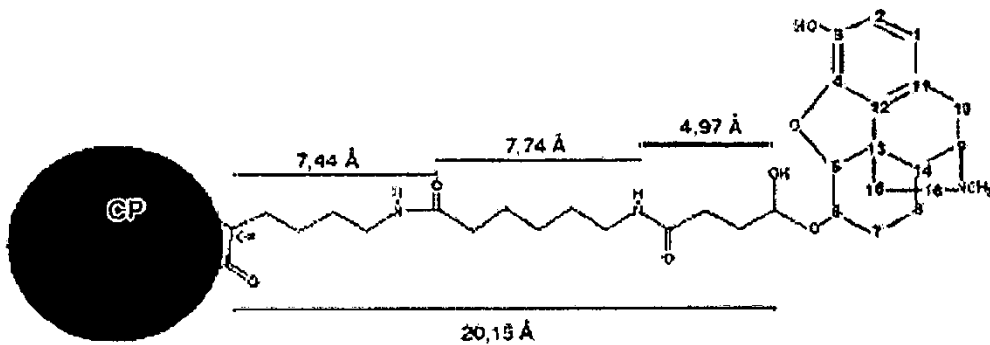


15 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa de formular la composición inmunógena con uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables y/o uno o más agentes farmacológicos.

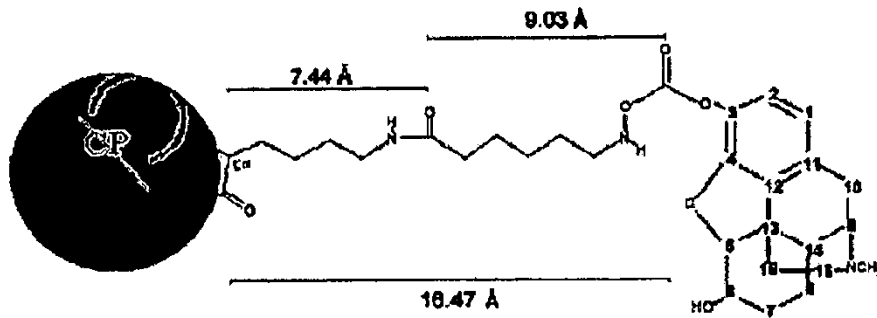
20 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el adyuvante farmacéuticamente aceptable es el hidróxido de aluminio.

10. Procedimiento según la reivindicación 8 o 9, en el que el agente farmacológico es la naltrexona.

25 11. Composición inmunógena bivalente contra la adicción a la morfina y la heroína que presenta una de las fórmulas estructurales siguientes:



30 0



en la que la proteína portadora (CP) es el toxoide tetánico.

5 12. Composición inmunógena de la reivindicación 11, que comprende además uno o más adyuvantes o agentes farmacológicos farmacéuticamente aceptables.

13. Composición inmunógena según la reivindicación 12, en la que el adyuvante farmacéuticamente aceptable es el hidróxido de aluminio y el agente farmacológico es la naltrexona.

10

FIGURA 1

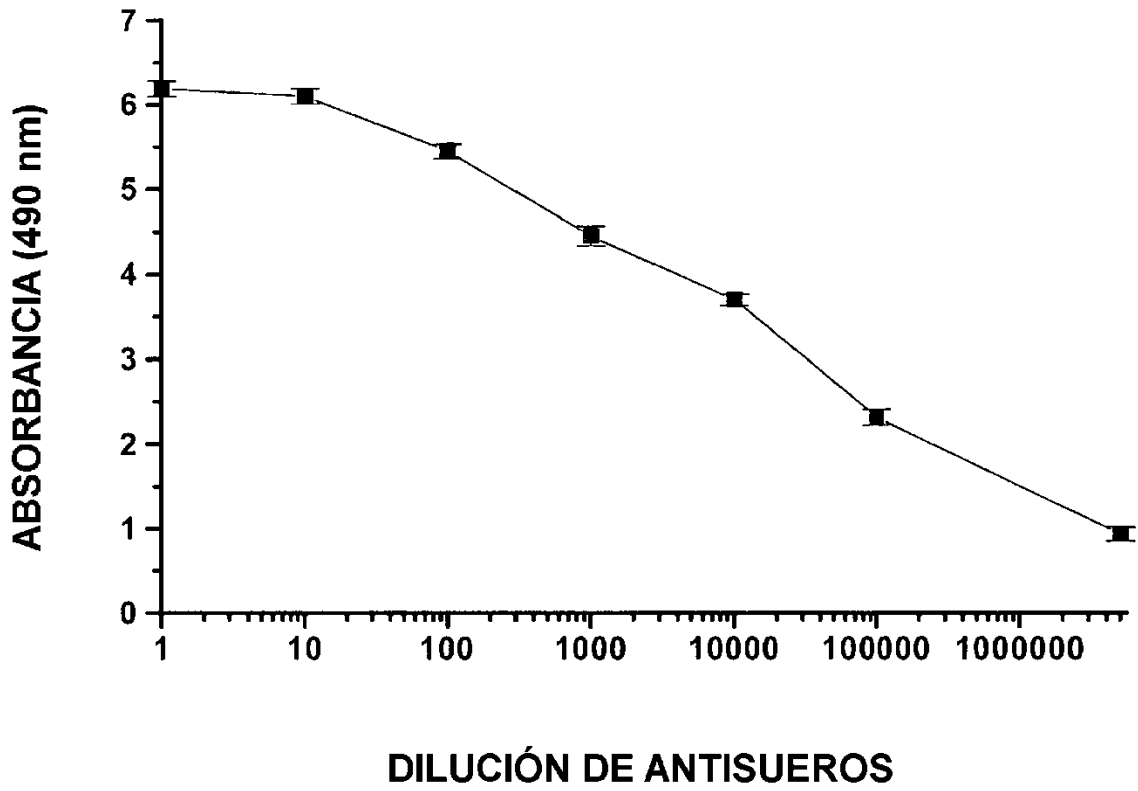


FIGURA 2

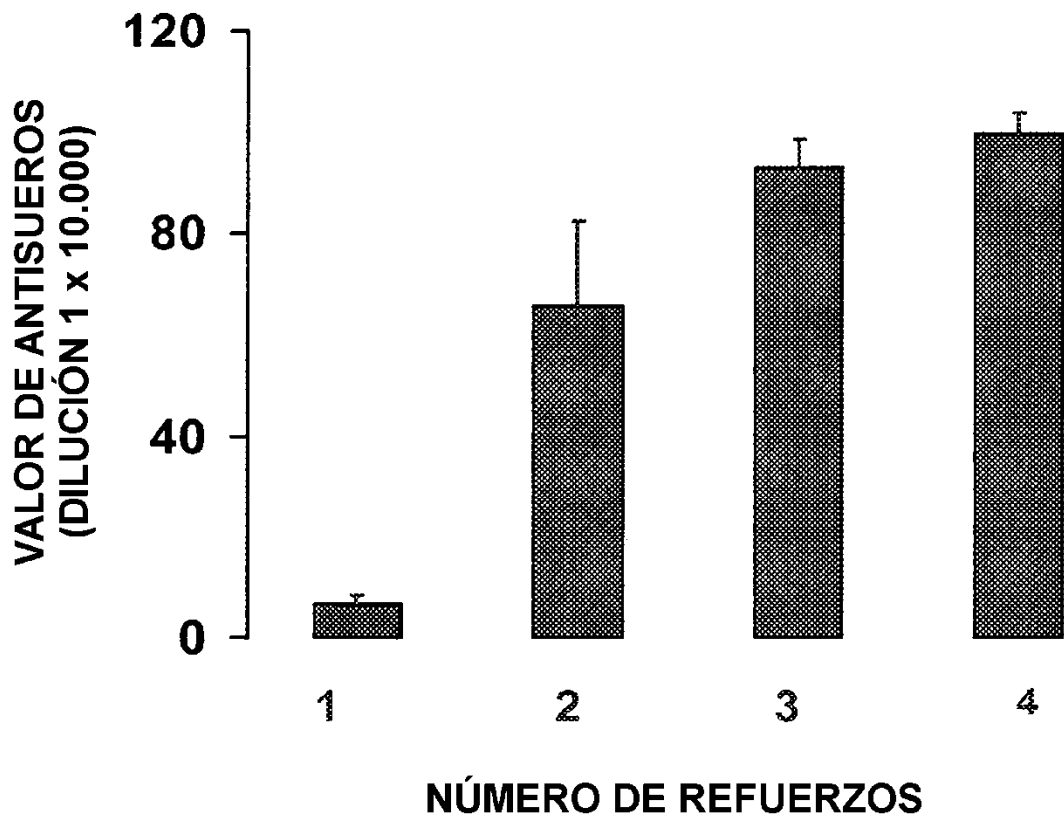


FIGURA 3

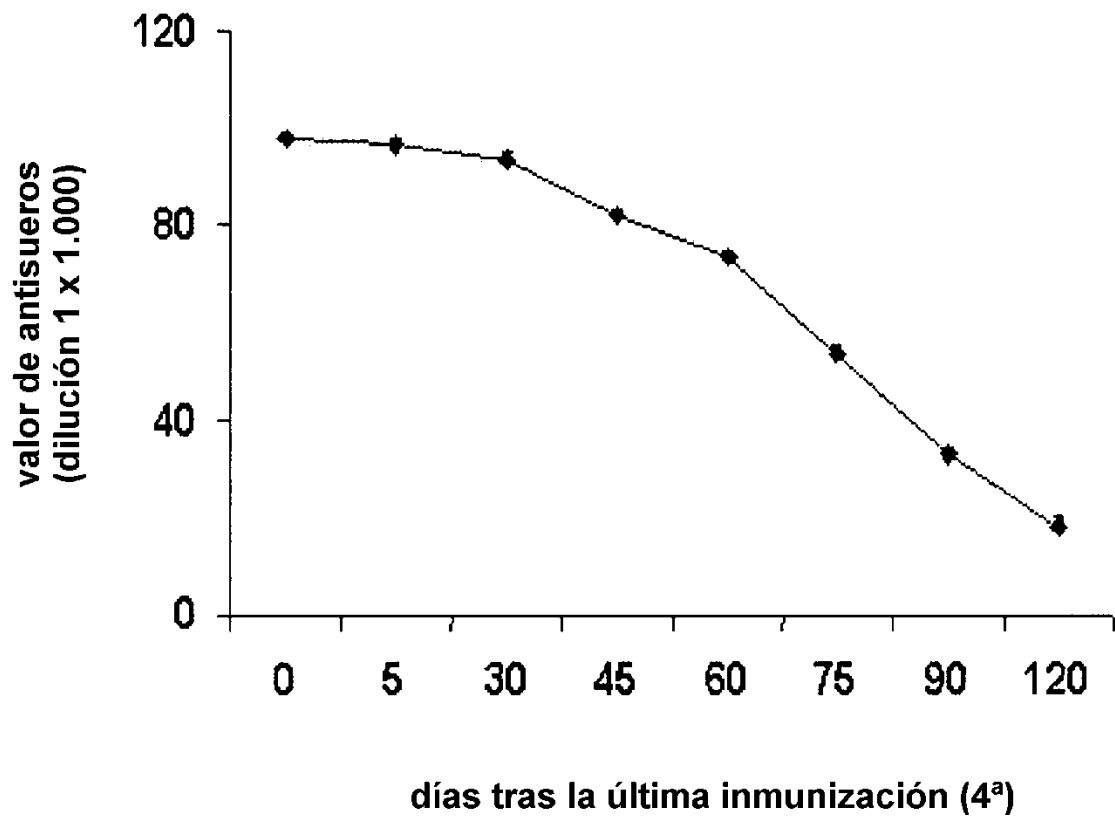


FIGURA 4

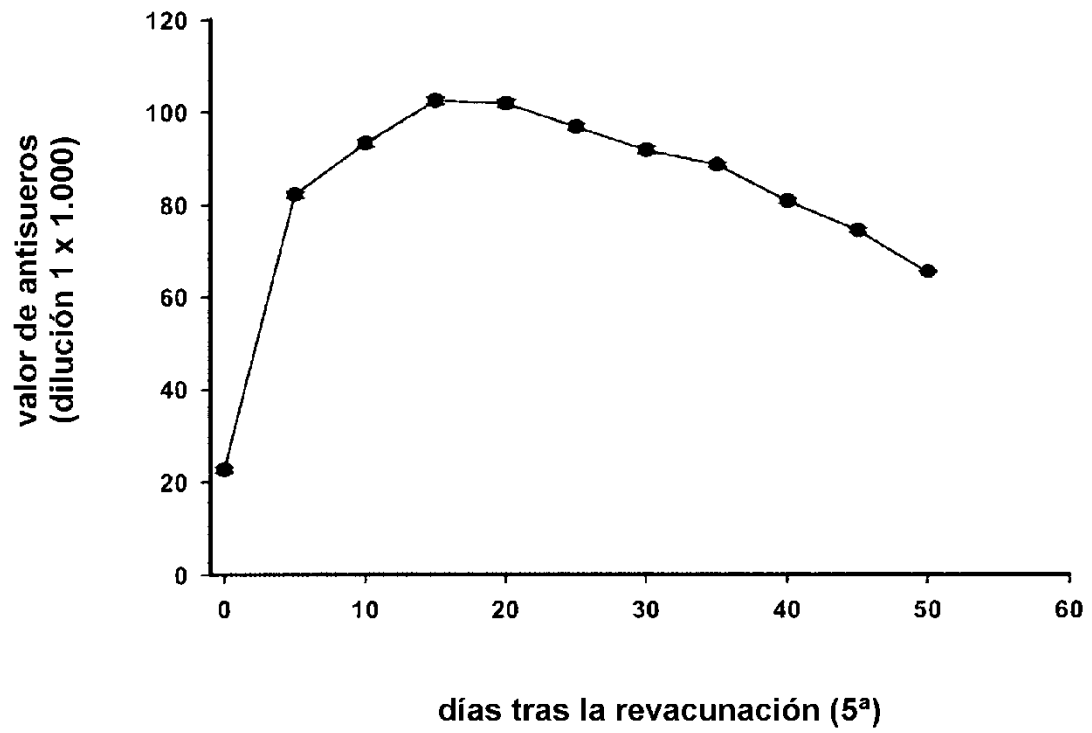


FIGURA 5

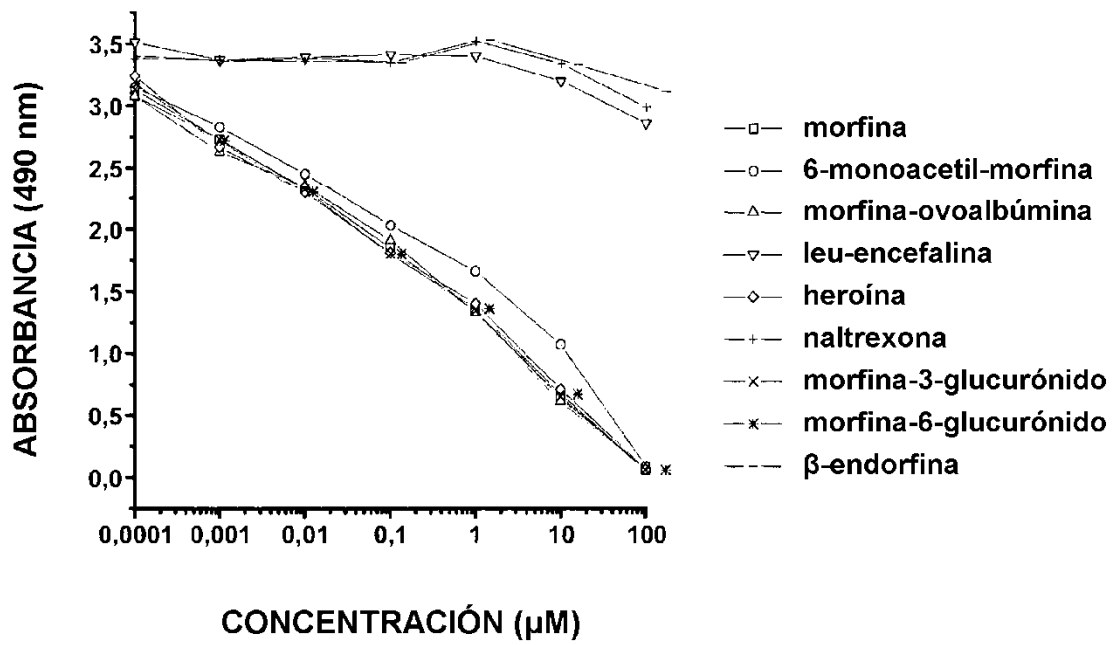


FIGURA 6

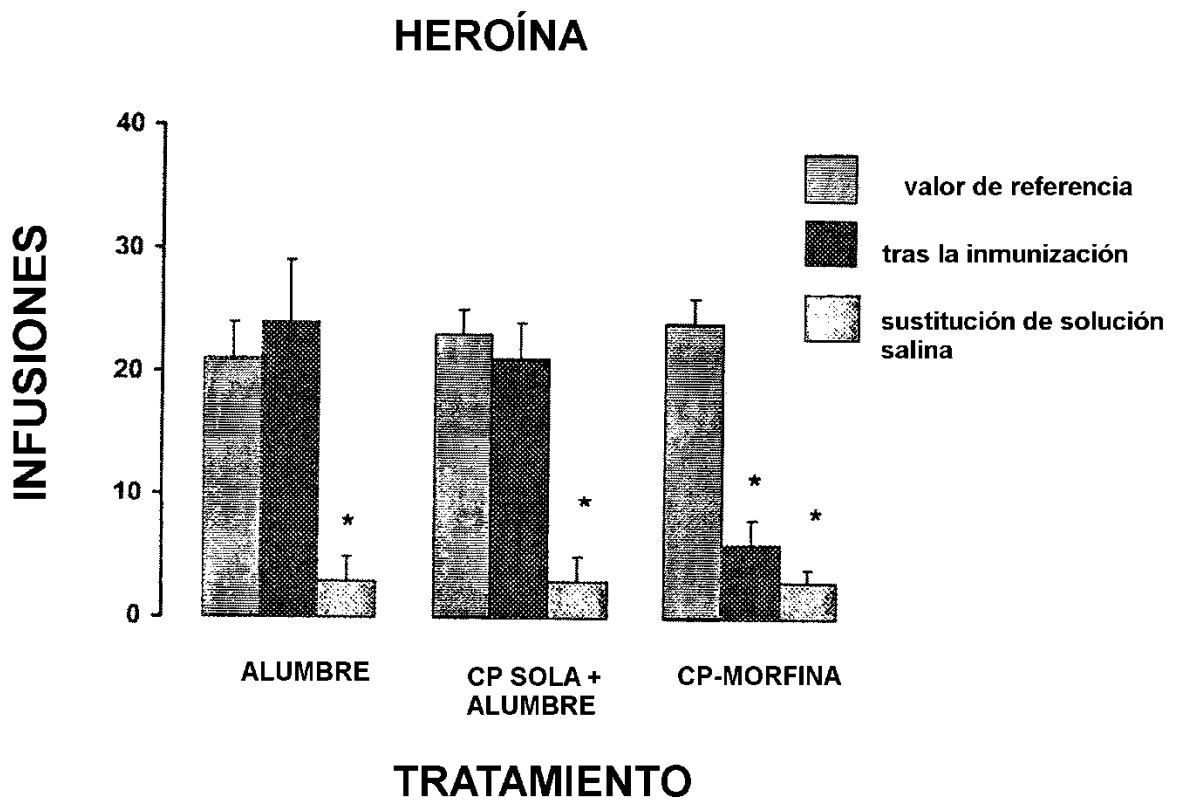


FIGURA 7

