

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 331**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2003 E 03772373 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1542729**

54 Título: **Producto inmunogénico estable que comprende unos heterocomplejos antigénicos**

30 Prioridad:

16.09.2002 FR 0211455

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

03.03.2014

73 Titular/es:

**NEOVACS (100.0%)
59, AVENUE VICTOR HUGO
75116 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**LE BUANEC, HÉLÈNE y
ZAGURY, DANIEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 445 331 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

Producto inmunogénico estable que comprende unos heterocomplejos antigénicos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a unos productos inmunogénicos estables que comprenden unos heterocomplejos proteicos inmunogénicos para la obtención de una respuesta inmunitaria humoral con producción de anticuerpos específicos dirigidos contra uno o varios antígenos, en particular contra a un antígeno "propio", así como a su utilización en el campo de las vacunas.

Técnica anterior

La obtención de una respuesta de anticuerpos de alto nivel contra un antígeno dado, en un individuo, es un objetivo buscado habitualmente, ya sea dicho antígeno un antígeno "extraño" o un antígeno "propio".

Sin embargo, el problema de un buen reconocimiento del antígeno contra el cual se busca una respuesta de anticuerpos, en un individuo, debe ser resuelto en algunos números de casos, en particular (a) cuando el antígeno de interés se comporta como un "hapteno", es decir una estructura química de baja masa molecular que es poco o nada inmunogénica en forma libre, pero que, una vez fijada sobre una molécula de alta masa molecular, es capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos de este hapteno, y (b) cuando el antígeno de interés es una proteína propia, es decir una proteína producida naturalmente en el individuo, para la cual existe una tolerancia inmunitaria debida a la supresión de los clones de linfocitos T correspondientes, durante el desarrollo del sistema inmunitario.

Con el fin de provocar, o de aumentar, el reconocimiento de un antígeno de interés por las células B, se han realizado diversas construcciones inmunogénicas en el estado de la técnica.

Una primera forma de estas construcciones inmunogénicas consiste en un acoplamiento covalente del antígeno de interés en una molécula portadora, aportando la molécula portadora unas estructuras reconocidas por los linfocitos T auxiliares (células "T helper") en asociación con unas moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), y que activan los linfocitos T auxiliares que producen entonces diversas citoquinas, entre ellas las IL-2, citoquinas que activarán a su vez los clones de células B específicas del antígeno de interés. Las células B específicas del antígeno de interés, una vez activadas, se multiplicarán y producirán unos anticuerpos específicos del antígeno de interés, que es el objetivo que se busca. En general, este tipo de construcciones inmunogénicas consiste en productos de acoplamiento químico covalente entre el antígeno de interés y la molécula portadora, los cuales, después de una etapa de purificación y eliminación de los productos no acoplados, son unos productos finales de estructura química bien definida.

La primera forma de una construcción inmunogénica anterior está por ejemplo ilustrada por el artículo de Richard *et al.*, que describe la preparación de productos de acoplamiento covalente entre la IL-9 y la ovalbúmina (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 97(2): 767-772). Está también ilustrada en la patente americana n° US 6,340,461 (Terman), que describe unos productos de acoplamiento entre una o varias copias de un antígeno de interés, contra la cual se busca una respuesta de anticuerpos específica en un individuo, y una molécula portadora constituida por un "superantígeno". El antígeno de interés está acoplado de manera exclusivamente covalente a la molécula portadora, por ejemplo con la ayuda del glutaraldehído (también denominado "pentanodial"), siendo los productos no acoplados de manera covalente eliminados con el fin de obtener un producto final químicamente bien definido.

En el estado de la técnica se describen otros productos de acoplamiento covalente. El artículo de Kim *et al.* (1999, Vaccine, Vol. 17 (n° 7-8): 597-603) describe unos inmuno-conjugados que comprenden un antígeno tumoral seleccionado de entre MUC1 y GD3, que está acoplado a la proteína portadora KLH. Kim *et al.* (1999) han descrito el papel de los inmuno-adyuvantes en la inducción de una respuesta de anticuerpos y de una respuesta celular de tipo T contra estos inmuno-conjugados. La solicitud PCT n° WO 96/27389 describe unos compuestos inmunogénicos desprovistos de toxicidad que derivan de una proteína de regulación de un virus VIH-1, VIH-2 o HTLV-2, por tratamiento químico con la ayuda de un agente de acoplamiento tal como un aldehído, o de una proteína portadora activada por un pre-tratamiento con la ayuda de un aldehído. La solicitud PCT n° WO 02/11759 describe unas vacunas que contienen, a título de principio activo, un inmunógeno que es un factor citoquínico o un factor de regulación celular con propiedades inmunosupresoras/angiogénicas. En particular, la solicitud WO 02/11759 describe unas vacunas que comprenden unos inmuno-conjugados entre diversas citoquinas y una proteína portadora.

Eventualmente, el producto de acoplamiento covalente entre el antígeno de interés y el superantígeno se puede preparar en forma de un polímero de dicho producto de acoplamiento, por ejemplo por fijación no covalente de los productos de acoplamiento monómeros entre sí, a través de interacciones iónicas, de interacciones de adsorción o también de interacciones biospecíficas. Por ejemplo, los productos de acoplamiento monoméricos pueden formar unos complejos con unas moléculas altamente cargadas positivamente o negativamente, gracias a puentes salinos

realizados en condiciones de baja fuerza iónica. Grandes complejos de productos de acoplamiento monoméricos son preparados utilizando unos polímeros cargados, tales como unos polímeros poli(ácido L-glutámico) o poli(L-lisina). Según otro modo de realización de un polímero de productos de acoplamiento monoméricos, los productos de acoplamiento exclusivamente covalente entre el antígeno de interés y el superantígeno pueden ser adsorbidos o acoplados de manera no covalente a la superficie de micropartículas, tales como bolas de látex u otros polímeros hidrófobos.

Una segunda forma de estas construcciones inmunogénicas, designada comúnmente estructura "MAP" (por Multi-Antigenic Protein") se presenta en general en forma de un esqueleto proteico constituido por un polímero de poli(lisina), lineal o ramificado, en el que se fijan de manera covalente uno o más antígenos de interés.

Una tercera forma de estas construcciones inmunogénicas consiste en unas micropartículas en las que se fijan el o los antígenos de interés. Se conocen unas formas variadas de micropartículas portadoras de antígenos.

Se conocen por ejemplo los iscoms (por "immunostimulating complexes"), que están constituidos por un complejo antigénico y por un adyuvante, el compuesto QuilA.

Se conocen también los liposomas, que poseen las mismas desventajas que los iscoms, a saber en particular una cierta toxicidad y unos efectos inmunológicos secundarios, debidos a su falta de pureza.

Se conocen también las micropartículas biodegradables, como los polímeros de ácido láctico y de ácido glutámico (Aguado y Lambert, 1992, *Immuno. Biol.*, Vol. 184: 113-125) o también unas partículas de almidón (solicitud de patente americana n° 2002/0098203 - Gutavsson *et al.*), en la matriz polimérica, de las cuales los antígenos de interés están atrapados. Estas partículas liberan el antígeno en su forma soluble durante la degradación de la matriz polimérica.

Se han descrito asimismo unas partículas constituidas exclusivamente por proteínas recombinantes híbridas, como se describen en la solicitud de patente francesa n° FR 2 635 532 (Thiollais *et al.*).

Se conocen también unas microesferas porosas en las que los antígenos están inmovilizados en el interior de los microporos por captación o acoplamiento físico, como se describe en la patente americana US n° 5.008.116 (Cahn).

Sin embargo, las diferentes soluciones propuestas en el estado de la técnica tienen todas en común por lo menos un inconveniente técnico relacionado con su modo de preparación, a saber la pérdida de una gran proporción del material antigénico de interés, debido a una etapa obligatoria de eliminación de los antígenos no acoplados o no adsorbidos.

Además, aunque las técnicas anteriores permiten realizar una asociación entre un antígeno de interés de baja masa molecular con una molécula portadora, estas son en general inadecuadas para el acoplamiento de un antígeno de interés de alta masa molecular, por ejemplo de más de 10 kDa, con la molécula portadora, debido en particular a los volúmenes estéricos que impiden el acoplamiento de un número elevado de moléculas de antígenos de interés de alta masa molecular a una misma molécula portadora.

Por último, la mayoría, si no la totalidad, de las construcciones antigénicas peptídicas conocidas abarcan en su estructura una sola molécula portadora, lo cual es un inconveniente técnico cuando el objetivo es inducir una respuesta inmunitaria preventiva o terapéutica al mismo tiempo contra el antígeno de interés y la molécula portadora en sí misma.

Por lo tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de construcciones inmunogénicas mejoradas que permitan la producción de un alto nivel de anticuerpos específicos de un antígeno de interés en un individuo en el que se busca dicha respuesta inmunitaria humoral, que sean poco costosas, sencillas de preparar y que puedan ser sintetizadas de manera reproducible.

Sumario de la invención

La presente invención describe nuevas construcciones inmunogénicas que permiten resolver los diversos problemas técnicos encontrados con las construcciones inmunogénicas conocidas en la técnica anterior, y que permiten satisfacer las diferentes técnicas descritas anteriormente.

La invención tiene por objeto un producto inmunogénico estable para la inducción de anticuerpos contra una o varias proteínas antigénicas en un sujeto, caracterizado porque consiste en unos heterocomplejos inmunogénicos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas y (ii) unas moléculas proteicas portadoras, y porque por lo menos el 1 por ciento y porque menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) por un enlace covalente, y porque la o las proteínas antigénicas (i) consisten en unas citoquinas producidas naturalmente por dicho sujeto.

La invención describe también un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos proteicos estables para la inducción de anticuerpos contra una o varias proteínas antigénicas en un sujeto, comprendiendo cada heterocomplejo (i) una pluralidad de proteínas antigénicas, relacionadas con (ii) una molécula proteica portadora, caracterizado porque, en dicho producto inmunogénico, por lo menos el 1 por ciento y menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas a las moléculas proteicas portadoras (ii) por un enlace covalente.

Preferentemente, el heterocomplejo inmunogénico constitutivo de dicho producto inmunogénico comprende de 5 a 50 proteínas antigénicas (i) para una molécula proteica portadora (ii), preferentemente de 20 a 40 proteínas antigénicas (i) para una molécula proteica portadora (ii).

Preferentemente, los enlaces covalentes entre una o varias de las proteínas antigénicas (i) y las moléculas proteicas portadoras (ii) están realizadas por medio de un agente químico de unión funcional.

Por molécula de interés antigénico, se entiende cualquier proteína que comprende uno o varios epítomos B de una proteína antigénica nativa contra la cual se busca la producción de anticuerpos. Dicha molécula de interés antigénico puede consistir en la proteína nativa propiamente dicha o un derivado proteico de la proteína nativa, tales como un fragmento peptídico de la proteína nativa, o también cualquier forma biológicamente inactiva de la proteína nativa obtenida por tratamiento químico, físico o por mutación genética. La proteína de interés puede consistir también en un homo-oligómero u homo-polímero de la proteína nativa o también en un homo-oligómero u homo-polímero de un fragmento peptídico de la proteína nativa. La proteína de interés antigénico puede consistir también en un hetero-oligómero o en un hetero-polímero que comprende una combinación de varios fragmentos peptídicos distintos inicialmente incluidos en la proteína nativa.

Según el modo de realización general de un producto inmunogénico tal como el descrito, la molécula proteica portadora (ii) es una proteína inmunogénica que induce la producción de linfocitos T helper y/o de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra las células que presentan en su superficie dicha molécula proteica portadora, o cualquier péptido que se deriva de la misma, en asociación con unas moléculas presentadoras del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), respectivamente de clase II y/o de clase I. La molécula proteica portadora (ii) puede ser también una proteína inmunogénica que induce al mismo tiempo la producción de linfocitos T helper y la producción de anticuerpos por unos linfocitos B dirigidos contra la proteína portadora.

Según un modo de realización particular de interés, el producto inmunogénico se caracteriza porque la molécula proteica portadora (ii) es una proteína inmunogénica que induce la producción de linfocitos citotóxicos dirigidos contra células que presentan en su superficie dicha molécula proteica portadora, o cualquier péptido que se deriva de la misma, en asociación con unas moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

Los productos inmunogénicos preferidos se seleccionan de entre los productos inmunogénicos que comprenden los heterocomplejos siguientes, en los que las proteínas antigénicas (i), por un lado y la molécula portadora proteica (ii) por otro, son respectivamente:

- a) (i) IL-4 y (ii) KLH;
- b) (i) interferón alfa y (ii) KLH;
- c) (i) VEGF y (ii) KLH;
- d) (i) IL-10 y (ii) KLH;
- e) (i) interferón alfa y (ii) gp 160 de VIH1;
- f) (i) IL-4 y (ii) el antígeno alérgeno Bet v 1; y
- g) (i) el VEGF y (ii) la proteína E7 de un *Papillomavirus*;
- h) (i) la proteína Tat de VIH1 biológicamente inactiva y (ii) la proteína gp 120 de VIH1;
- i) (i) un anticuerpo humano de isotipo IgE y (ii) la proteína Tat de VIH1 inactiva;
- j) (i) el fragmento β del ricino y (ii) KLH.

La invención describe asimismo una composición, en particular una composición farmacéutica, una composición inmunogénica o una composición vacunal, caracterizada porque comprende un producto inmunogénico tal como se ha definido anteriormente.

Se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de un producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a) incubar las proteínas antigénicas (i), que consisten en unas citoquinas producidas naturalmente por un sujeto, y la molécula portadora (ii) en una relación molar (i):(ii) de 5:1 a 50:1, en presencia de un agente químico de unión;
- b) estabilizar los heterocomplejos formados en la etapa a) mediante un tratamiento con el formaldehído;
- c) recuperar el producto inmunogénico que comprende los heterocomplejos inmunogénicos que se ha

preparado en la etapa b).

Descripción de las figuras

5 La figura 1 ilustra la caracterización del producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos KLH-VEGF murinos por isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de una revelación de las proteínas por inmunotransferencia ("Western Blot").

10 La figura 2 ilustra la caracterización del producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos KLH-VEGF humanos por isoelectroenfoque con revelación con azul de coomassie, seguido de una inmunotransferencia ("Western Blot"). A la izquierda de la figura se representa el gel de isoelectroenfoque. A la derecha de dicha figura se representan los geles de inmunotransferencia utilizando unos anticuerpos anti-KLH (a la izquierda) o anti-VEGF humano (a la derecha).

15 La figura 3 ilustra la caracterización del producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos KLH-IL4 humanos por isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de una revelación de las proteínas por inmunotransferencia ("Western Blot").

20 La figura 4 ilustra la caracterización del producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos gp 160-IFN α , por isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de una revelación de las proteínas por inmunotransferencia ("Western Blot").

25 La figura 5 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-VEGF murino, por determinación del título de anticuerpos obtenidos tras la inmunización de los ratones. Figura 5A: ratones inmunizados con el VEGF murino. Figura 5B: ratones inmunizados con el producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos KLH-VEGF. Figura 5C: ratones control inyectados con el adyuvante incompleto de Freund (AIF).

30 La figura 6 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-VEGF murino, por determinación del poder neutralizante de los anticuerpos obtenidos después de la inmunización, frente a la actividad angiogénica de la proteína VEGF.

35 La figura 7 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-VEGF humano por determinación del título de anticuerpos obtenidos después de la inmunización de los ratones.

La figura 8 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-VEGF humano, por determinación del poder neutralizante de los anticuerpos obtenidos después de la inmunización, frente a la actividad angiogénica de la proteína VEGF, medida por la proliferación de las células endoteliales.

40 La figura 9 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-IL4 murino por determinación del título de anticuerpos obtenidos después de la inmunización.

45 La figura 10 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-IL4 murino por determinación del poder neutralizante de los anticuerpos obtenidos después de la inmunización, frente a la actividad de inducción de la proliferación de las células HT-2 por IL4.

50 La figura 11 ilustra los resultados de producción de anticuerpos de clase IgG e IgE dirigidos contra Bet v 1, después de la inyección de polen de abedul, a ratones previamente inmunizados con un producto inmunogénico según la invención que comprende unos heterocomplejos KLH-IL4.

La figura 12 ilustra la actividad inmunogénica (humoral) del producto inmunogénico KLH-IL4 humano por determinación del poder neutralizante de los anticuerpos obtenidos después de la inmunización, frente a la actividad de inducción de la proliferación de las células TF-1 por IL4.

55 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona nuevas construcciones inmunogénicas que inducen un alto nivel de producción de anticuerpos específicos de un antígeno de interés, en el individuo.

60 Los heterocomplejos proteicos inmunogénicos de la invención

Según la invención, se ha mostrado que la producción de un alto nivel de anticuerpos específicos de un antígeno de interés se obtiene, en un individuo, mediante la inmunización de este individuo con un producto inmunogénico en el que dicho antígeno de interés está asociado a una molécula proteica portadora, siendo la asociación entre dicho antígeno de interés y dicha proteína portadora parcialmente covalente y parcialmente no covalente.

Más específicamente, se ha mostrado según la invención que se obtiene una excelente respuesta de anticuerpos contra un antígeno de interés cuando se inmuniza un individuo con un producto inmunogénico estable que comprende unos heterocomplejos proteicos, en el que los heterocomplejos están constituidos por asociaciones estables entre dicho antígeno de interés y dicha molécula proteica portadora y en el que sólo una baja proporción de estas asociaciones se deben a un enlace covalente entre el antígeno de interés y la molécula proteica portadora, siendo las otras asociaciones entre el antígeno de interés y la molécula proteica portadora realizadas por unas enlaces débiles, interacciones iónicas, uniones hidrógenas, fuerzas de Van der Waals, etc.

En particular, se ha mostrado según la invención que se alcanza una respuesta de anticuerpos óptima cuando, en un producto inmunogénico estable tal como el descrito anteriormente, menos del 40 por ciento de las moléculas del antígeno de interés están unidas por un enlace covalente con las moléculas proteicas portadoras. Según la invención, una molécula del antígeno de interés unida a una molécula proteica portadora por "un" enlace covalente significa que dicha molécula del antígeno de interés está unida de manera covalente, químicamente, a dicha molécula proteica portadora, por lo menos por un enlace covalente, es decir eventualmente por dos enlaces covalentes o más.

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

Por ejemplo, la determinación del porcentaje de moléculas de antígeno de interés unidas a las moléculas de proteína portadora por un enlace covalente en un producto inmunogénico de la invención se puede realizar según las etapas siguientes:

- (i) someter dicho producto inmunogénico a una solución en condiciones desnaturalizantes y reductoras,
- (ii) realizar una etapa de cromatografía de exclusión de tamaño con el producto obtenido al final de la etapa (i) durante la cual los diferentes constituyentes proteicos de masas moleculares decrecientes se eluyen sucesivamente del soporte cromatográfico de exclusión de tamaño,
- (iii) medir la cantidad de antígeno de interés unido por un enlace covalente a la molécula portadora en la fracción de eluido que contiene los constituyentes proteicos que tienen la masa molecular más alta,
- (iv) comparar la cantidad de antígeno de interés medida en la etapa (iii) con la cantidad total de antígeno de interés incluida inicialmente en el producto inmunogénico de partida.

En la etapa (i) del procedimiento de determinación del porcentaje de enlaces covalentes descrito anteriormente, la incubación de una cantidad dada (en número de moles o en peso) del producto inmunogénico de la invención en condiciones desnaturalizantes y reductoras conlleva una disociación de los enlaces débiles entre los diferentes constituyentes proteicos no unidos entre sí por un enlace covalente.

Unas condiciones desnaturalizantes preferidas son la presencia de urea, por ejemplo a la concentración final de 8M, o también la presencia de SDS, por ejemplo a la concentración final del 1% en peso total de la solución que contiene el producto inmunogénico. Unas condiciones reductoras preferidas son la presencia de β -mercaptoetanol, por ejemplo a la concentración final del 5% del volumen total de la solución que contiene el producto inmunogénico.

En la etapa (ii) del procedimiento de determinación del porcentaje de moléculas de antígenos de interés y de moléculas de proteína portadora unidas entre sí por unos enlaces covalentes, el soporte de cromatografía de exclusión de tamaño es seleccionado por el experto en la materia según sus conocimientos generales técnicos. Por ejemplo, el experto en la materia puede recurrir a los soportes cromatográficos comercializados por la compañía Pharmacia bajo los nombres comerciales de "superdex 75TM" y de "Superdex 200TM".

En la etapa (ii), la fracción molecular que corresponde a la molécula portadora unida de manera covalente a las moléculas de antígeno de interés es eluida en primer lugar, antes de la o de las fracciones de eluido que contienen el antígeno de interés en forma libre. El antígeno de interés que está eluido en forma libre corresponde a la fracción de antígeno de interés, que no estaba unido por un enlace covalente a la molécula portadora, dentro del producto inmunogénico de partida. Es en la fracción proteica de masa molecular alta donde se realiza la medida de la cantidad de antígeno de interés unido de manera covalente a la molécula proteica portadora, por ejemplo en un ensayo inmuno-enzimático, en un ensayo radioinmunológico o en un ensayo por inmunofluorescencia, directo o indirecto ("sándwich"), utilizando unos anticuerpos específicos del antígeno de interés y que no presentan ninguna reacción inmunológica cruzada con la molécula proteica portadora.

En la etapa (iii), se compara la cantidad de antígeno de interés unido de manera covalente a la molécula proteica portadora, que se ha medido como se ha descrito anteriormente, con la cantidad inicial de antígeno de interés incluida inicialmente en la cantidad dada (en número de moles o en peso) del producto inmunogénico de partida, y se calcula así el porcentaje de antígeno de interés que está unido de manera covalente a la molécula proteica

portadora, en el producto inmunogénico de la invención.

El porcentaje de moléculas proteicas portadoras y de proteínas antigénicas de interés unidas entre sí por unos enlaces covalentes, en un producto inmunogénico de la invención, puede ser verificado fácilmente también por el experto en la materia según un segundo método que comprende las etapas siguientes:

- a) inmovilización sobre un soporte de anticuerpos dirigidos específicamente contra la proteína portadora;
- b) puesta en contacto de los anticuerpos contra la proteína portadora, que han sido inmovilizados sobre el soporte en la etapa a), con una cantidad conocida de moléculas del producto inmunogénico a ensayar que comprende dicha proteína portadora y una proteína antigénica de interés;
- c) eliminación de las moléculas del producto inmunogénico que no están unidas a los anticuerpos anti-proteína portadora inmovilizados en la etapa a), con la ayuda de una solución acuosa tampón que comprende uno o varios agentes que desnaturalizan las proteínas;
- d)
 - d1) puesta en contacto (i) de los complejos inmunogénicos formados en la etapa c) entre los anticuerpos anti-proteína portadora inmovilizados y las moléculas del producto inmunogénico con (ii) unos anticuerpos dirigidos específicamente contra la proteína portadora;
 - d2) separadamente de la etapa d1), puesta en contacto (i) de los complejos inmunógenos formados en la etapa c) entre los anticuerpos anti-proteína portadora inmovilizados y las moléculas del producto inmunogénico con (ii) unos anticuerpos específicamente contra la proteína antigénica de interés;
- e)
 - e1) cuantificación de los anticuerpos añadidos en la etapa d1) que se han unido a la proteína portadora;
 - e2) cuantificación de los anticuerpos añadidos en la etapa d2) que se han unido a la proteína antigénica;
- f) cálculo de la relación entre:
 - (i) la cantidad de anticuerpos fijados a la anti-proteína portadora medida en la etapa e1); y
 - (ii) la cantidad de anticuerpos fijados a la anti-proteína antigénica medida en la etapa e2),

consistiendo dicha relación en la proporción de moléculas proteicas portadoras y de moléculas de proteína antigénica de interés que están unidas entre sí por unos enlaces covalentes dentro del producto inmunogénico de partida.

En la etapa c) del procedimiento anterior, la utilización de una solución acuosa de lavado que contiene uno o varios agentes de desnaturalización de las proteínas conlleva una desnaturalización del producto inmunogénico fijado a los anticuerpos anti-proteína portadora, lo cual tiene por efecto liberar en la solución de lavado las moléculas de proteína antigénica de interés que no están unidas por un enlace covalente a las moléculas de proteína portadora. Así, en la etapa d2) del procedimiento, solo están cuantificadas las moléculas de proteína antigénica de interés que están unidas por enlaces covalentes a las moléculas de proteína portadora.

Preferentemente, la solución tampón desnaturalizante utilizada en la etapa c) contiene un agente tensioactivo, tal como el Tween20[®], a la concentración final de 0,1% v/v.

En las etapas d1) y d2), las cantidades de anticuerpos fijados son preferentemente medidas por incubación de los complejos antígenos-anticuerpos formados al final de cada una de estas etapas con un nuevo anticuerpo que está marcado por una molécula detectable, respectivamente:

- (i) en la etapa d1), un nuevo anticuerpo dirigido contra el anticuerpo antiproteína portadora y marcado por una molécula detectable;
- (ii) en la etapa d2), un nuevo anticuerpo dirigido contra el anticuerpo antiproteína antigénica de interés y marcado por una molécula detectable

La molécula detectable es indistintamente una molécula radioactiva, una molécula fluorescente o una enzima. Como enzima, se puede utilizar en particular la peroxidasa, cuya presencia está revelada por colorimetría después de la incubación con el sustrato orto-fenilendiamina (OPD).

En los ejemplos se describe un protocolo detallado del procedimiento anterior.

A título ilustrativo, se ha demostrado según la invención, con la ayuda del primer o del segundo procedimiento de cuantificación descritos anteriormente que:

- 5 - en el producto inmunogénico que comprende los heterocomplejos entre la molécula portadora KLH y unas moléculas de interferón alfa humano, del 3% al 8% de las moléculas de interferón alfa están unidas de manera covalente a la molécula proteica portadora KLH;
- 10 - en el producto inmunogénico que comprende los heterocomplejos entre la molécula proteica portadora KLH y unas moléculas de IL-4 murino, aproximadamente el 11% de las moléculas de IL-4 están unidas de manera covalente a la molécula proteica portadora KLH.

No hace falta decir que, según las preparaciones, el porcentaje de moléculas de proteína antigénica de interés unidas por un enlace covalente a las moléculas de proteínas portadoras puede variar significativamente. Sin embargo, en todos los casos, este porcentaje es siempre inferior al 40%.

15 La invención tiene por objeto un producto inmunogénico estable para la inducción de anticuerpos contra una o varias proteínas antigénicas en un sujeto, caracterizado porque consiste en unos heterocomplejos inmunogénicos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas y (ii) unas moléculas proteicas portadoras, y porque por lo menos el 1 por ciento y menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas por un enlace covalente a las moléculas proteicas portadoras (ii), y porque la o las proteínas antigénicas (i) consisten en unas citoquinas producidas naturalmente por dicho sujeto.

20 La invención describe asimismo un producto inmunogénico estable que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos proteicos para la inducción de anticuerpos contra una o varias proteínas antigénicas en un sujeto, comprendiendo cada heterocomplejo (i) una pluralidad de proteínas antigénicas, unidas a (ii) una molécula proteica portadora, caracterizado porque, en dicho producto inmunogénico, por lo menos el 1 por ciento y menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas por un enlace covalente con las moléculas proteicas portadoras (ii).

25 De manera muy preferida, los anticuerpos cuya producción es inducida por el producto inmunogénico de la invención consisten en unos anticuerpos "neutralizantes" o "bloqueantes". Un anticuerpo "neutralizante" o un anticuerpo "bloqueante" se define, según la invención, como un anticuerpo cuya fijación sobre la proteína nativa diana bloquea la actividad biológica de esta proteína nativa, lo cual es un objetivo importante buscado por la invención, cuando la proteína nativa contra la cual los anticuerpos están dirigidos posee una actividad biológica nociva para el organismo, en el contexto patológico considerado de un individuo a tratar, por ejemplo cuando la proteína nativa posee una actividad angiogénica, una actividad inmunosupresora o también una actividad alérgica, en particular una actividad de inducción de la producción de interleucina-4.

30 Por "molécula proteica portadora", incluida en el producto inmunogénico de la invención, se entiende cualquier proteína o péptido de por lo menos 15 aminoácidos de longitud, sea cual sea su secuencia en aminoácidos, y que, asociándose de manera parcialmente covalente a las moléculas de antígeno de interés para formar los heterocomplejos proteicos constitutivos del producto inmunogénico de la invención, permite la presentación de un gran número de moléculas de antígeno de interés a los linfocitos B.

35 Según un primer aspecto, una molécula proteica portadora consiste en una proteína o un péptido de por lo menos 15 aminoácidos de longitud, o también en un oligómero de dicho péptido, que comprende uno o varios epítomos T auxiliares ("helper") capaces de activar los linfocitos T auxiliares (T helper) del organismo hospedante para la producción de citoquinas, incluida la interleucina 2, citoquinas que activarán e inducirán a su vez la proliferación de los linfocitos B los cuales, después de la maduración, producirán unos anticuerpos contra la proteína antigénica (i).

40 Según un segundo aspecto, una molécula proteica portadora consiste en una proteína o un péptido de por lo menos 15 aminoácidos de longitud, o también en un oligómero de dicho péptido, que comprende además uno o varios epítomos T auxiliares ("helper") descritos en el primer aspecto anteriormente, uno o varios epítomos T-citotóxicos capaces de inducir una respuesta inmunitaria celular por producción de linfocitos T-citotóxicos específicos de la molécula proteica portadora, siendo estos linfocitos capaces de reconocer específicamente unas células que expresan en su superficie dicha proteína portadora o cualquier péptido que se deriva de ella, en asociación con unas moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Llegado el caso, la molécula proteica portadora consiste en un oligómero de una proteína o de un péptido que comprende además uno o varios epítomos T helper, uno o varios epítomos T-citotóxicos definidos anteriormente.

45 Según un tercer aspecto, una molécula proteica portadora consiste en una proteína o un péptido de por lo menos 15 aminoácidos de longitud, o también en un oligómero de dicho péptido, que comprende además uno o varios epítomos T auxiliares ("helper") definidos en el primer aspecto, uno o varios epítomos B, capaces de inducir la producción de anticuerpos por unos linfocitos dirigidos contra la proteína portadora.

50 En algunos modos de realización, la proteína portadora, además de su función T helper, utilizada para activar una

respuesta de anticuerpos contra el antígeno de interés, puede también activar una respuesta citotóxica contra las células portadoras de péptidos del portador y/o estimular una respuesta de anticuerpo contra la molécula proteica portadora.

5 La molécula proteica portadora puede también consistir en un homo-oligómero o un homo-polímero o una proteína nativa de la cual deriva o también en un homo-oligómero o un homo-polímero de un fragmento peptídico de la proteína nativa de la cual se deriva. La molécula proteica portadora puede también consistir en un hetero-oligómero o en un hetero-polímero que comprende una combinación de varios fragmentos peptídicos distintos inicialmente incluidos en la proteína nativa de la cual derivan.

10 Por "proteína antigénica", se describe cualquier proteína o cualquier péptido de por lo menos 10 aminoácidos de longitud, incluyendo un péptido hapteno, susceptible de ser reconocido específicamente por los receptores para el antígeno expresados por los linfocitos B de un organismo hospedante, humano o animal, particularmente cualquier mamífero, proteína antigénica que, una vez incluida en un producto inmunogénico de la invención, estimula la producción de anticuerpos que reconocen dicha proteína antigénica.

15 Por "proteína antigénica" se describe también cualquier proteína que comprende uno o varios epítomos B de una proteína antigénica nativa contra la cual se busca la producción de anticuerpos. Dicha molécula de interés antigénica puede consistir en la proteína nativa en sí misma o un derivado proteico de la proteína nativa, tales como un fragmento peptídico de la proteína nativa, o también cualquier forma biológicamente inactiva de la proteína nativa obtenida por tratamiento químico, físico o por mutación genética. La proteína de interés antigénica puede también consistir en un homo-oligómero o homo-polímero de la proteína nativa o también en un homo-oligómero o homo-polímero de un fragmento peptídico de la proteína nativa. La proteína de interés antigénica puede también consistir en un hetero-oligómero o en un hetero-polímero que comprende una combinación de varios fragmentos peptídicos distintos inicialmente incluidos en la proteína nativa.

20 En un producto inmunogénico según la invención, ventajosamente menos del 30 por ciento, y preferentemente menos del 20 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas por un enlace covalente con las moléculas proteicas portadoras (ii).

30 En un producto inmunogénico según la invención, por lo menos el 1 por ciento, y preferentemente por lo menos el 2 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas con las moléculas portadoras (ii) por un enlace covalente.

35 Se ha mostrado que un producto inmunogénico de la invención, tal como se ha definido anteriormente, era estable en solución acuosa. La estabilidad de un producto inmunogénico de la invención está caracterizada en particular porque dicho producto inmunogénico posee un punto isoeléctrico propio, distinto del punto isoeléctrico de por lo menos uno de sus constituyentes proteicos, respectivamente la proteína antigénica (i) y la molécula proteica portadora (ii), y porque migra en consecuencia según una banda proteica distinta de por lo menos una de las bandas proteicas que corresponden respectivamente a dos elementos proteicos que lo constituyen en unos ensayos de isoelectroenfoque.

40 Se ha observado también, mediante unos ensayos de inmuno-transferencias ("Western blot") que el producto inmunogénico de la invención migraba en gel de electroforesis, en condiciones no desnaturizantes, según una sola banda proteica, lo cual ilustra el hecho de que dicho producto inmunogénico se presenta en forma de una población homogénea de construcciones proteicas solubles.

45 Además, se ha mostrado que la proteína antigénica (i) así como la molécula proteica (ii), incluidas en forma de heterocomplejos proteicos en el producto inmunogénico de la invención, eran ambas reconocidas por unos anticuerpos que reconocen específicamente cada una de estas proteínas. Así, el producto inmunogénico según la invención comprende la proteína antigénica (i) y la molécula proteica portadora (ii) en su conformación nativa. Esta característica técnica del producto inmunogénico según la invención es particularmente ventajosa para la inducción de una respuesta inmunitaria contra unos antígenos nativos, es decir una respuesta inmunitaria eficaz y realmente protectora del organismo hospedante. Se ha mostrado en particular que un producto inmunogénico según la invención inducía, en el organismo hospedante en el que era administrado, la inducción de una fuerte respuesta humoral eficaz contra unos antígenos nativos acompañados de la producción de anticuerpos neutralizantes o bloqueantes frente a la actividad biológica nociva de estos antígenos nativos.

50 Según la invención, se ha mostrado con diversos antígenos de interés, que la respuesta inmunitaria humoral obtenida con un producto inmunogénico tal como el definido anteriormente era superior de 10 a 1000 veces a la respuesta inmunitaria humoral obtenida con una administración de un conjugado covalente clásico entre el antígeno de interés y la molécula proteica portadora.

55 Preferentemente, en un heterocomplejo inmunogénico incluido en el producto inmunogénico de la invención, la pluralidad de proteínas antigénicas (i) está constituida por una pluralidad de ejemplares de una proteína antigénica única.

65

Así, según un modo de realización más preferido, el producto inmunogénico de la invención es aplicado para la obtención de anticuerpos específicos contra un solo antígeno de interés.

Se ha mostrado asimismo según la invención que un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos tales como los definidos anteriormente estaban particularmente bien adaptados para la inmunización de un individuo, por la producción de anticuerpos, contra un antígeno de interés "propio" (self antigen), es decir contra una proteína producida normalmente por dicho individuo, para el cual existe una tolerancia del sistema inmunitario, en particular una delección por lo menos parcial de los clones de linfocitos T auxiliares (células T helper) que reconocen específicamente dicho antígeno.

En otras palabras, la presentación de un antígeno "propio" a las células del sistema inmunitario de dicho individuo, en forma del producto inmunogénico, que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos de la invención, permite "romper" la tolerancia del sistema inmunitario del individuo frente a este antígeno. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, el solicitante piensa que la posibilidad de obtener un alto nivel de respuesta de anticuerpo contra un antígeno "propio" se debe a la presencia, dentro del heterocomplejo, de numerosos epítomos de tipo "T auxiliar" (o T helper) portados por la molécula proteica portadora, que activan los linfocitos T auxiliares, y que las diversas citoquinas producidas por los linfocitos T auxiliares activados, en particular la IL-2, permite promover una activación de las células B a antígenos "propios" presentes en estado latente en el organismo, y romper así la tolerancia inmunitaria de las células B a los antígenos "propios".

Así, según un modo de realización preferido, el producto inmunogénico de la invención se caracteriza porque las proteínas antigénicas (i) están constituidas por una pluralidad de ejemplares de una proteína normalmente reconocida como una proteína propia por las células del sistema inmunitario de dicho sujeto.

Debido a que la mayor proporción, más del 60 por ciento, de las asociaciones entre el antígeno de interés y la molécula proteica portadora están realizadas por unas interacciones no covalentes, no existe ninguna limitación teórica del número de moléculas de antígeno de interés asociadas a una única molécula proteica portadora, salvo la accesibilidad estérica de las moléculas de antígeno de interés a esta molécula portadora. En particular, el número de moléculas de antígeno de interés asociadas a una misma molécula proteica portadora no está limitado por el número de funciones químicamente reactivas portadas por la molécula portadora que permite la creación de enlaces covalentes con una pluralidad de moléculas del antígeno de interés. En consecuencia, el único límite físico parece ser el número de sitios de la molécula proteica portadora (ii) que son accesibles a la proteína antigénica (i).

Por las mismas razones, el tamaño del antígeno de interés a asociar a la molécula proteica portadora no está tampoco estrictamente limitado, pudiendo el antígeno de interés en consecuencia consistir en unas proteínas enteras de por lo menos 10 kDa, tales como las diferentes citoquinas como la IL-4, la IL-10, la VEGF o también el interferón alfa.

Además, incluso para los antígenos de interés que consisten en unas proteínas enteras de una masa molecular superior a 10 kDa, un heterocomplejo inmunogénico de la invención puede comprender una asociación de varios antígenos de interés sobre una sola molécula portadora, si el tamaño de la proteína portadora lo permite.

Cuando la molécula proteica portadora es de tamaño pequeño, por ejemplo de un tamaño inferior a 10 kDa, o incluso inferior a 5 kDa, el solicitante piensa, sin desear estar ligado a ninguna teoría, que las asociaciones parcialmente covalentes entre el antígeno de interés y dicha proteína portadora, que forman los heterocomplejos proteicos incluidos en el producto inmunogénico de la invención, permiten una conformación de los heterocomplejos tal que al mismo tiempo el antígeno de interés y la molécula proteica portadora son accesibles a los receptores de las células del sistema inmunitario.

Se trata incluso de una ventaja técnica suplementaria proporcionada por el producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos tales como los definidos anteriormente, ya que la presentación a los linfocitos B de una pluralidad de ejemplares de un antígeno de interés sobre una misma molécula portadora, comprendida en el heterocomplejo, favorece el fenómeno de "capping" por "cross-linking" de los receptores de la célula B que reconocen el antígeno, lo cual contribuye a la activación de la célula B que recibe, por otra parte, las señales de activación que provienen de las citoquinas producidas por los linfocitos T auxiliares activados gracias a los epítomos T auxiliares portados por la molécula proteica portadora.

Así, según un modo de realización más preferido del producto inmunogénico, este comprende de 5 a 50 proteínas antigénicas (i) para una molécula proteica portadora (ii), preferentemente de 20 a 40 proteínas antigénicas (i) para una molécula proteica portadora (ii).

El número de moléculas de antígeno de interés sobre una sola molécula proteica portadora depende respectivamente del tamaño de la molécula portadora y del tamaño de la molécula del antígeno de interés. Cuanto mayor es la molécula portadora y ofrezca una gran superficie de asociación con el antígeno de interés, más comprenderá el heterocomplejo inmunogénico, para una sola de las moléculas portadoras que contiene, un número elevado de ejemplares de la molécula del antígeno de interés. Asimismo, cuanto más reducido sea el tamaño de la

molécula del antígeno de interés, mayor es el número de ejemplares de la molécula del antígeno de interés en la misma molécula portadora.

5 A título ilustrativo, se ha mostrado según la invención que cuando la molécula proteica portadora es la KLH, de 20 a 40 moléculas de IL-4, de IL-10, de interferón alfa o de VEGF están asociados con cada molécula portadora.

10 Se ha mostrado que la solubilidad del producto inmunogénico en una solución acuosa varía con la modificación de los equilibrios que rigen las interacciones moleculares dentro de los heterocomplejos, en particular los equilibrios electroquímicos que dependen de uniones denominadas "débiles" (no covalentes) o también las concentraciones respectivas de las proteínas antigénicas y de la molécula proteica portadora, así como con las condiciones de fuerza iónica, de pH y de temperatura.

15 Preferentemente, los enlaces covalentes entre una o varias de las proteínas antigénicas (i) y la molécula proteica portadora (ii) están realizados por medio de un agente químico de unión bifuncional.

Tal agente químico puede ser el bromuro de cianógeno, el glutaraldehído, la carbodiimida o el anhídrido succínico.

20 Como carbodiimida, se pueden utilizar por ejemplo los compuestos siguientes: 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida, 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida, (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

Como agentes de acoplamiento homo-bifuncionales, se pueden citar los compuestos siguientes:

- 25 - ésteres de N-hidroxisuccinimida, de ditiobis(succinimidilpropionato), disuccinimidilsuberato, y disuccinimidiltartrato; los imidoésteres bifuncionales dimetiladipimidato, dimetilpimelimidato, y dimetilsuberimidato;
- 30 - los agentes reactivos con un sulfhidrilo, 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano, bismaleimidohexano, y bis-N-maleimido-1,8-octano;
- los halogenuros bifuncionales de tipo 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzocloruro de arilo y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona;
- 35 - el SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato);
- el SIAB (N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato),
- 40 - el SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato),
- el GMBS (N-(.gamma.-maleimidobutirilo) succinimida éster),
- el MPBH (ácido 4-(4-N-maleimidopohenil) butírico hidrazida);
- 45 - el M2C2H (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida),
- el SMPT (succinimidiloxycarbonil-.alfa.-metil-.alfa.-(2-piridilditio)tolueno); y
- 50 - el SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato).

Preferentemente, el agente químico de unión utilizado comprende por lo menos dos funciones aldehído reactivas.

De manera más preferida, el agente químico de unión es el glutaraldehído.

55 Después de la formación del producto que comprende los heterocomplejos proteicos gracias al acoplamiento de las moléculas proteicas portadoras con las proteínas antigénicas con la ayuda del agente químico de unión, el producto obtenido se estabiliza gracias a un agente de estabilización de las proteínas, el formaldehído, susceptible de crear unas uniones intracatenarias.

60 Los productos inmunogénicos que comprenden unos heterocomplejos inmunogénicos de la invención se presentan en forma de micropartículas solubles en solución, en particular en solución acuosa, cuyo tamaño medio varía según (i) el tamaño de la molécula proteica portadora, (ii) el tamaño y el número de proteínas antigénicas asociadas a una misma molécula proteica portadora y (iii) el número de moléculas portadoras asociadas a las proteínas antigénicas presentes en una partícula de heterocomplejo.

65 Se ha observado que las micropartículas de heterocomplejos descritas en los ejemplos tenían un tamaño medio que

varía de 100 nm a 300 nm.

Un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos proteicos inmunogénicos de la invención comprende exclusivamente unas moléculas portadoras asociadas a las proteínas antigénicas, con la exclusión de cualquier otro material. En particular, un heterocomplejo de la invención no comprende ningún material polimérico, proteico o no proteico, a excepción de las proteínas portadoras y antigénicas que lo caracterizan.

Recientemente, ZAGURY D *et al.* (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(14): 8024-8029), en un estudio bibliográfico, sugieren inducir una inmunidad anti-citoquina en los pacientes con el fin de contrarrestar la producción anormal en estas patologías de ciertas citoquinas, en particular unas interleucinas, linfoquinas, monoquinas, interferones que actúan fisiológicamente en los tejidos, localmente como factor de proliferación, de diferenciación o de muerte celular programada.

Estos autores precisan que las estrategias de terapéutica con vacunas han sido, hasta ahora, exclusivamente dirigidas sobre el agresor antigénico, ya sea un microorganismo, una célula o un alérgeno, pero no se ha buscado jamás combatir la desregulación de las citoquinas inducidas bajo el efecto del agresor. Estos autores proponen una vacunación anti-citoquina como paso previo a una vacunación convencional cuyo objetivo sería neutralizar o bloquear los efectos inmunotóxicos del estroma, y permitir el desarrollo normal de la reacción inmunitaria adaptada contra el agresor antigénico.

Además, unos trabajos anteriores de la solicitante, relatados en la solicitud internacional publicada bajo el nº WO 00/03732, han mostrado que, en el caso de la leucemia ATL, del cáncer del cuello uterino, y del sarcoma de Kaposi, respectivamente tres proteínas estaban implicadas en una inmunosupresión local a nivel de tumores o de células infectadas por el VIH1:

la proteína Tax del virus HTLV 1,
la proteína E7 del *papillomavirus*, y
la proteína Tat del virus VIH-1.

La solicitante había descrito también que algunas de estas proteínas inmunosupresoras, tales como la proteína Tat del VIH1 y la proteína E7 de HPV (cepas 16 y 18) también tienen unos efectos activadores sobre las células endoteliales vasculares.

Había propuesto, en consecuencia, el desarrollo de vacunas anti-cancerígenas o antivirales que comprenden un compuesto inmunogénico derivado desintoxicado de una proteína que proviene de células cancerosas, de células infectadas por un virus o de células inmunitarias estromales, inicialmente inmunosupresora y/o angiogénica de acción local, como por ejemplo una proteína derivada de la proteína Tat del virus VIH1, la proteína Tax de un virus HTLV1, la proteína E7 de un papilomavirus o también una lectina manano-dependiente, en forma inactiva.

Ahora bien, se muestra según la invención que el producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos tales como los definidos anteriormente permiten la inducción de una fuerte respuesta de anticuerpos contra las diferentes moléculas antigénicas nocivas anteriores.

Según un primer aspecto, en el heterocomplejo inmunogénico de la invención, la o las proteínas antigénicas (i) consisten en citoquinas producidas naturalmente por dicho sujeto.

De manera preferida, la o las proteínas antigénicas (i) se seleccionan de entre la interleucina-4, el interferón alfa, el interferón gamma, la VEGF, la interleucina-10, el TNF alfa, el TGF beta, la interleucina-5 y la interleucina-6.

Según un aspecto, la o las proteínas antigénicas (i) constitutivas de un heterocomplejo inmunogénico de la invención son unas proteínas inmunosupresoras o angiogénicas, o unas proteínas derivadas de proteínas inmunosupresoras o angiogénicas.

De manera preferida, la o las proteínas antigénicas (i), inmunosupresoras o angiogénicas, se seleccionan de entre la proteína E7 de un papilomavirus, la proteína Tat del virus VIH 1, la proteína Tax del virus HTLV 1 o HTLV 2 y la propia proteína p53.

Según otro aspecto descrito, la o las proteínas antigénicas (i) constitutivas de un heterocomplejo inmunogénico de la invención son unas proteínas tóxicas de baja dosis, para el ser humano o para un mamífero no humano. Se trata muy particularmente de las diversas proteínas que son letales para el ser humano a una dosis inferior a 1 mg, inferior a 100 µg, inferior a 10 µg, incluso inferior a 1 µg. Se trata principalmente de las proteínas tóxicas susceptibles de ser utilizadas para la fabricación de armas denominadas "biológicas" tales como el ricino, las toxinas botulínicas, las enterotoxinas de estafilococo, o también una proteína tóxica de ántrax (EF, LF, PA).

La molécula proteica portadora (ii) incluida en un heterocomplejo proteico inmunogénico de la invención puede ser una molécula portadora utilizada convencionalmente en inmunología, tal como el KLH, la ovoalbúmina, la albúmina

sérica bovina (ASB), el Tétanos toxoide, la toxina colérica B, etc.

Además, en un producto inmunogénico de la invención, la molécula portadora proteica se puede seleccionar para inducir o estimular, además de la producción de linfocitos T helper, una respuesta inmunitaria citotóxica y/o humoral contra sí misma y de su contrapartida de la proteína nativa en el organismo hospedante, respectivamente por la activación de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos B específicos de esta molécula portadora.

Este modo de realización particular de un producto inmunogénico de la invención es particularmente útil cuando se busca simultáneamente una respuesta de anticuerpo eficaz contra una proteína nociva inmunosupresora o angiogénica, en particular por la producción de anticuerpos neutralizantes o bloqueantes, y una respuesta inmunitaria celular efectuada por unos linfocitos T citotóxicos dirigidos contra unas células que presentan en su superficie el antígeno nativo asociado a las moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), por ejemplo un antígeno de un patógeno como el virus VIH1 o un Papilomavirus, o un antígeno específicamente expresado en las células cancerosas, como la CEA, la p53, el Di12, etc.

Así, según este modo de realización particular, el producto inmunogénico de la invención se caracteriza porque la molécula proteica portadora (ii) es una proteína inmunogénica que induce, además de la producción de linfocitos T helper, la producción de linfocitos T citotóxicos dirigidos contra células que presentan en su superficie dicha molécula proteica portadora, o cualquier péptido que se deriva de ella, en asociación con unas moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), y/o la producción de anticuerpos por unos linfocitos B dirigidos contra la proteína portadora.

Así, los productos inmunogénicos que comprenden unos heterocomplejos inmunogénicos de la invención constituyen unos medios inmunológicos eficaces para la vacunación terapéutica activa de un individuo, ya sea mamífero humano o mamífero no humano, contra una gran diversidad de patologías.

Unos ejemplos ilustrativos de composición de heterocomplejos inmunogénicos contenidos en un producto inmunogénico tal como el descrito para prevenir o tratar, mediante una vacunación terapéutica activa, diversas patologías son indicados a continuación.

a) *Para la prevención o el tratamiento del SIDA:*

- Molécula proteica portadora (ii): las proteínas gp 120, gp 160, p24, p17, nef o Tat del virus VIH1, desintoxicadas o estabilizadas si es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o también una proteína inmunogénica que se deriva de ella (Zagury *et al.*, 1998).

Se puede utilizar igualmente la proteína gp 120 mimotopo que está descrita por Fouts *et al.* (2000) y por Fouts *et al.* (2002).

- Proteína antigénica (i): las proteínas Tat, IFN α , IL10 y TGF β , desintoxicada si es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o una proteína inmunogénica que se deriva de ella.

b) *Para la prevención o el tratamiento del cáncer del cuello uterino:*

- Molécula proteica portadora (ii): las proteínas L1, L2 y E7 del papilomavirus, preferentemente de un papilomavirus de la cepa 16 o 18, desintoxicada o estabilizada si es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella (Le Buanec *et al.*, 1999).

- Proteína antigénica (i): las proteínas E7, IFN α , IL10, TGF β , TNF α y VEGF, desintoxicadas o estabilizadas si es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o una proteína inmunogénica que se deriva de ella.

c) *Para la prevención o el tratamiento de la leucemia ATL inducida por los virus HTLV1 o 2:*

- Molécula proteica portadora (ii): las proteínas gp61 y Tax de los virus HTLV 1 o 2, desintoxicada si es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella (Cowan *et al.*, 1997; Mon *et al.*, 1996).

- Proteína antigénica (i): las proteínas Tax, IL10, IFN α o TGF β , TNF α , VEGF desintoxicadas, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella.

d) *Para la prevención o el tratamiento del cáncer del colon:*

- Molécula proteica portadora (ii): las proteínas CEA y p53, desintoxicadas si eso es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella

(Zusman *et al.*, (1996).

- Proteína antigénica (i): las proteínas IFN α , TGF β , IL10, FasL y VEGF, desintoxicadas, unos fragmentos peptídicos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella.

e) Para la prevención o el tratamiento del cáncer de mama:

- Molécula proteica portadora (ii): la proteína Di12, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína que se deriva de ella (Yoshiji *et al.*, 1996).
- Proteína antigénica (i): las proteínas TGF β , TNF α y VEGF, desintoxicadas si eso es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella.

f) Para la prevención o el tratamiento del cáncer del páncreas:

- Molécula proteica portadora (ii): la proteína CaSm, desintoxicada si eso es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de esta proteína o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella.
- Proteína antigénica (i): las proteínas VEGF y TNF α , desintoxicadas o estabilizadas si eso es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella.

g) Para la prevención o el tratamiento del cáncer de la próstata:

- Molécula proteica portadora (ii): las proteínas OSA y ETS2, desintoxicadas o estabilizadas si eso es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella. (Sementchenko VI *et al.*, 1998).
- Proteína antigénica (i): las proteínas IL6 y TGF β , desintoxicadas o estabilizadas si eso es necesario, unos fragmentos inmunogénicos de estas proteínas o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella. (Adler *et al.*, 1999).

h) Para la prevención o el tratamiento de algunas alergias:

- Molécula proteica portadora (ii) se selecciona de entre los alógenos moleculares, tales como las proteínas Bet v 1 (polen de abedul), Der p 1 (ácaros) y Fel d 1 (gato), sus fragmentos peptídicos inmunogénicos o incluso una proteína inmunogénica que se deriva de ella. El antígeno Bet v 1 está descrito en particular por Ferreira *et al.* (1993), el antígeno Der p 1 está descrito en particular por Tovey *et al.* (1981) y el antígeno Fel d 1 está descrito en particular por Morgenstern *et al.* (1991)
- Proteína antigénica (i): induce la producción de anticuerpos neutralizantes o bloqueantes contra el factor citoquínico IL4, que es producido principalmente por los linfocitos T de tipo Th2, que orientan la respuesta inmunitaria humoral hacia la producción de anticuerpos de isotipo IgE. Según otro modo de realización, la proteína antigénica (i) induce la producción de anticuerpos neutralizantes o bloqueantes en contra del factor citoquínico IL5, que está producido principalmente por los linfocitos T de tipo Th2.

Según también otro modo de realización, la prevención de la alergia puede ser realizada con la ayuda de un producto inmunogénico que induce una respuesta de anticuerpo contra el principal efecto de la granulación de los basófilos, los anticuerpos isotipo IgE. Con este objetivo, la invención proporciona un producto inmunogénico que comprende (i) un anticuerpo humano de isotipo IgE y (ii) la proteína Tat inactiva del VIH1.

i) Para la prevención contra las proteínas letales utilizadas en las armas biológicas

Igualmente, un producto inmunogénico tal como el descrito, puede ser utilizado para inmunizar a unos individuos contra numerosos productos tóxicos utilizados, en particular, en las armas químicas y biológicas, como por ejemplo el ricino. Entre las proteínas más tóxicas contra las cuales se busca una inmunización, principalmente por la producción de anticuerpos, se prefieren las toxinas botulínicas, el ricino, las enterotoxinas de estafilococo, las toxinas de *Clostridium perfringens* y las proteínas tóxicas del ántrax.

De manera general, para realizar un producto inmunogénico tal como el descrito anteriormente, en el que la proteína antigénica (i) es una proteína altamente tóxica del tipo anterior, se utiliza una proteína previamente destoxificada en forma de un toxoide. Para destoxificar la proteína, antes de su utilización para preparar un producto inmunogénico según la invención, se pueden utilizar diversos métodos, y preferentemente uno de los métodos siguientes:

- a) tratamiento de la proteína tóxica nativa por el glutaraldehído;
- b) tratamiento de la proteína tóxica nativa por acción combinada del formol y del glutaraldehído; o

c) llegado el caso, por modificación química de los grupos His y Tyr con la ayuda de reactivos apropiados, por ejemplo por carboximetilación de estos residuos de aminoácidos.

5 Para la prevención de la acción letal de toxinas que provienen de *Bacillus anthracis*, se utiliza preferentemente como proteínas antigénicas (i), una proteína destoxificada que proviene de una toxina de ántrax seleccionada de entre las proteínas EF («Edema Factor»), LF («Lethal Factor») y PA («Protective Antigen»).

10 Para la prevención de la acción letal de toxinas que provienen de *Clostridium perfringens*, se utiliza preferentemente, como proteína antigénica (i), una proteína destoxificada que proviene de la toxina Epsilon de *Clostridium perfringens*.

15 Para la prevención de la acción letal de toxinas que provienen de *Clostridium botulinum*, se utiliza preferentemente, como proteínas antigénicas (i), una proteína destoxificada que proviene de una toxina botulínica seleccionada de entre las toxinas A, B, C, D, E, F y G, que son naturalmente sintetizadas en forma de una cadena polipeptídica única de 150 kDa, o también el fragmento H_c de las toxinas botulínicas, poseyendo dicho fragmento H_c una masa molecular de aproximadamente 50 kDa.

20 Para producir las toxinas botulínicas inactivas, el experto en la materia puede utilizar cualquier técnica conocida por sí misma, en particular las utilizadas para preparar unas composiciones vacunales anteriores, tales como las descritas por Fiock *et al.* o por Siegel *et al.* (Fiock, M.A., Cardella, M.A., Gearinger, N.F., J. Immunol., 1963, 90, 697-702; Siegel, L.S., J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 2351-2356).

25 Para la prevención de la acción letal de toxinas que provienen de la semilla de ricino (*Ricinus communis*), se utiliza preferentemente como proteína antigénica (i), una proteína destoxificada que proviene de la toxina del ricino, preferentemente el fragmento β del ricino.

Así, la invención describe también un producto inmunogénico que comprende (i) el fragmento β del ricino y (ii) la proteína KLH.

30 Para purificar el ricino, el experto en la materia puede utilizar cualquier técnica conocida, tales como las descritas por Osborne *et al.*, Kabat *et al.* o Kunitz *et al.* (Osborne, T.B., Mendel, L.B. y Harris, J.F.: Amer. J. Physiol., 1905, 14, 259-269; Kabat, E.A. Heidelberger, M. y Bezer, A.E.: J. Biol. Chem., 1947, 168, 629-; Kunitz, M. y McDonald, M.: J. Gen. Physiol., 1948, 22, 25-Moulé Y.: Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 1461-1467). Puede asimismo utilizar las técnicas de purificación por cromatografía de afinidad descritas por Tomila *et al.*, Nicolson *et al.* u Olsnes *et al.* (Tomila, M. Kurokawa, T. Onozaki, K. et al.: Experientia, 1972, 28, 84-85; Nicolson, G.L y Blaustein, J.: J. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 266, 543-547; Olsnes, S. Salvedt, E. y Pihl, A.: J. Biol. Chem., 1974, 249, 803-810). Las cadenas A y B del ricino pueden ser purificadas tal como se describe por Hedge *et al.* (Hedge, R. y Podder, S.K.: Eur. Biochem., 1998, 254, 596-601).

40 Para la prevención de la acción letal de toxinas que provienen de estafilococo, y más particularmente de *Staphylococcus aureus*, se utiliza preferentemente como proteína antigénica (i), una proteína destoxificada que proviene de una toxina seleccionada de entre la SEA («Staphylococcal Enterotoxin A»), la SEB («Staphylococcal Enterotoxin B»), la SEC («Staphylococcal Enterotoxin C»), la SED («Staphylococcal Enterotoxin D»), la SEE («Staphylococcal Enterotoxin E»), la SEG («Staphylococcal Enterotoxin G»), la SEH («Staphylococcal Enterotoxin H»), la SEI («Staphylococcal Enterotoxin I») y la TSST-1 («Toxic Shock Syndrome Toxin-1»).

Las enterotoxinas anteriores pueden ser preparadas por el experto en la materia con la ayuda de las técnicas descritas en los trabajos referenciados anteriormente, en relación con la descripción de cada una de estas toxinas.

50 La SEA está sintetizada en forma de una enterotoxina precursora de 257 aminoácidos (Huang, I.Y., Hughes, J.L., Bergdoll, M.S. y Schantz, E.J.: J. Biol. Chem. 1987, 262, 7006-7013). La toxina madura de masa molecular igual a 27100 Da deriva de la toxina precursora por pérdida de una secuencia líder hidrófoba N-terminal de 24 residuos de aminoácidos (Betley, M.J. y Mekalanos, J.J.: J. Bacteriol., 1998, 170, 34-41). SEA existe en 3 isoformas diferentes por su PI.

55 La proteína precursora de SEB comprende 267 aminoácidos (Mr=31 400 Da) con un péptido señal N-terminal de 27 aminoácidos. Su sitio de fijación al receptor de células T («T-Cell Receptor» o «TCR») abarca la cavidad de baja profundidad, mientras que la molécula de MHC clase II se fija en un sitio adyacente (Kappler, J.W., Herman, A., Clements, J. y Marrack, P.: J. Exp. Med., 1992, 175, 387-396; Papageorgiu, A.C., Trauter, H.S. y Acharya, K.R.: J. Mol. Biol., 1998, 277, 61-79; Soos, J.M. y Johnson, H.M.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 201, 596-602).

60 La SEC presenta 2 subtipos SEC 1, SEC 2 y SEC 3 antigénicamente distintos. La proteína precursora contiene 267 residuos de aminoácidos (Houde, C.J., Hackett, S.P. y Bohach, G.A.: Mol. Gen. Genet., 1990, 220, 329-333) con un péptido señal de 27 residuos de aminoácidos (Bohach, G.A. y Schlievert, P.M.: Infect. Immun., 1989, 57, 2243-2252).

65

La SED está formada de 258 residuos de aminoácidos con un péptido señal de 30 residuos de AA. Su estructura tridimensional es parecida a la estructura de los otros superantígenos bacterianos.

La SEE, cuya masa molecular es de 26000 Da presenta el 81% de homología de secuencia en AA con SEA.

La SEG está constituida por 233 residuos de aminoácidos (Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J. y Welch, R.A.: infect. Immun., 1998, 66,3337-3348).

La SEH presenta una masa molecular de 27300 Da (Su, Y.C. y Wongi A.C.: Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61,1438-1443). No da reacción inmunológica cruzada con las otras enterotoxinas.

La SEI tiene una secuencia que comprende 218 residuos de aminoácidos. Es la toxina que presenta el nivel más bajo de homología con las otras enterotoxinas.

La SEJ formada de 269 residuos de aminoácidos presenta una homología de secuencia en AA elevada con SEA, SEE y SED (64-66%).

Preferentemente, un producto inmunogénico tal como el descrito anteriormente comprende, en combinación, varias proteínas antigénicas (i) derivadas cada una de una proteína tóxica anterior, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 proteínas antigénicas (i) derivadas cada una de una proteína tóxica anterior.

Por ejemplo, un producto inmunogénico tal como el descrito anteriormente para la preparación de una composición vacunal destinada a prevenir la toxicidad de las enterotoxinas de estafilococo comprende preferentemente 2, 3, 4 o 5 proteínas antigénicas (i) derivadas cada una de una enterotoxina de estafilococo.

Según un modo de realización particular de un producto inmunogénico tal como el descrito, en el que la o las proteínas antigénicas (i) son derivadas de proteínas altamente tóxicas para el ser humano, la proteína portadora consiste en la proteína KLH.

Así, según un primer aspecto particular de un producto inmunogénico tal como el descrito, en el que la molécula proteica portadora induce al mismo tiempo la producción de linfocitos T auxiliares ("T helper"), de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos B específicos de la molécula proteica portadora, dicha molécula proteica portadora (ii) se selecciona de entre las proteínas L1, L2 y E7 de un Papilomavirus.

Según un segundo aspecto particular de un producto inmunogénico de la invención, en el que la molécula proteica portadora induce, además de la producción de linfocitos T auxiliares ("T helper"), la diferenciación de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos B específicos de la molécula proteica portadora, dicha molécula proteica portadora (ii) se selecciona de entre las proteínas gp160, p24, p17, Nef y Tat del virus HIV1.

Según un tercer aspecto particular de un heterocomplejo inmunogénico de la invención, en el que la molécula proteica portadora induce al mismo tiempo la producción de linfocitos T auxiliares ("T helper"), de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos B específicos de la molécula proteica portadora, dicha molécula proteica portadora (ii) se selecciona de entre las proteínas CEA, p53, Di12, CaSm, OSA y ETS2.

Según un cuarto aspecto particular de un producto inmunogénico de la invención, en el que la molécula proteica portadora induce, además de la diferenciación de linfocitos T auxiliares ("T helper"), la producción de anticuerpos dirigidos contra la molécula proteica portadora, dicha molécula proteica portadora (ii) se selecciona de entre las proteínas Bet v 1, Der p 1 y Feldt.

En un producto inmunogénico tal como el descrito, los heterocomplejos proteicos inmunógenos preferidos se seleccionan de entre los heterocomplejos siguientes, en los que las proteínas antigénicas (i), por un lado y la molécula portadora proteica (ii) por otro, son respectivamente:

- a) (i) IL-4 y (ii) KLH ;
- b) (i) interferón alfa y (ii) KLH;
- c) (i) VEGF y (ii) KLH ;
- d) (i) IL-1.0 y (ii) KLH ;
- e) (i) interferón alfa y (ii) gp1 60 de VIH1
- f) (i) IL-4 y (ii) el antígeno alérgeno Bet v 1; y
- g) (i) la VEGF y (ii) la proteína E7 de un Papilomavirus;
- h) (i) la proteína Tat inactiva de VIH1 y (ii) la proteína gp 120 de VIH1.
- (i) (i) un anticuerpo humano de isotipo IgE y (ii) la proteína Tat de VIH1 inactiva;
- (j) (i) el fragmento β del ricino y (ii) KLH.

Procedimiento de preparación de un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos proteicos inmunogénicos de la invención

La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos tales como los definidos anteriormente, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 5
- a) incubar las proteínas antigénicas (i) que consisten en unas citoquinas producidas naturalmente por un sujeto y la molécula portadora (ii) en una relación molar (i):(ii) de 5:1 a 50:1, en presencia de un agente químico de unión;
 - 10 b) estabilizar los heterocomplejos formados en la etapa a) mediante tratamiento con el formaldehído;
 - c) recuperar el producto inmunogénico que comprende los heterocomplejos inmunogénicos preparados en la etapa b).

15 Preferentemente, el agente químico de unión es el glutaraldehído.

De manera totalmente preferida, el procedimiento está además caracterizado porque la etapa a) está seguida de una etapa de estabilización del producto que comprende los heterocomplejos inmunogénicos por el formaldehído, previamente a la etapa c) de recuperación de los heterocomplejos.

20 Preferentemente, cuando el glutaraldehído se utiliza como agente químico de unión, está presente en el medio de reacción de acoplamiento a una concentración final comprendida entre 0,002M y 0,03M, ventajosamente entre 0,02M y 0,03M, preferentemente a la concentración final de 0,026M.

25 La reacción de acoplamiento con el glutaraldehído está ventajosamente realizada, durante 20 minutos a 60 minutos, preferentemente 30 minutos, a una temperatura que va de 20 a 25°C.

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

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

40 Las composiciones que comprenden un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos proteicos inmunogénicos de la invención

La presente invención tiene asimismo por objeto una composición que comprende un producto inmunogénico tal como el definido anteriormente.

45 La invención es asimismo relativa a una composición farmacéutica que comprende un producto inmunogénico proteico tal como el definido anteriormente.

50 La invención tiene también por objeto una composición inmunogénica caracterizada porque comprende, a título de principio activo, un producto inmunogénico tal como el definido anteriormente, en asociación con uno o varios excipientes fisiológicamente compatibles.

55 Se refiere igualmente a una composición vacunal caracterizada porque comprende, a título de principio activo, un producto inmunogénico tal como el definido anteriormente, en asociación con uno o varios excipientes fisiológicamente compatibles.

60 Según los objetivos perseguidos, se utilizan unos adyuvantes sistémicos o unos adyuvantes mucosales. Por ejemplo, se utiliza preferentemente un adyuvante mucosal para prevenir los cánceres de los tejidos epiteliales y se utilizan preferentemente unos adyuvantes sistémicos para prevenir o tratar las infecciones por unos virus, tales como por VIH1 y HTLV1, o también para prevenir o tratar las alergias.

Entre los adyuvantes sistémicos, se utilizan preferentemente los adyuvantes de tipo IFA (Adyuvante Incompleto de Freund), el fosfato de calcio o el hidróxido de alúmina.

65 Entre los adyuvantes mucosales, se utilizan preferentemente unos adyuvantes como la cloratoxina B (CTB) o un mutante de la toxina LT (LT μ).

Según un aspecto particular, una composición inmunogénica según la invención comprende asimismo uno o varios agentes inmunoestimulantes, en combinación con un adyuvante de la inmunidad, como por ejemplo el agente inmunoestimulante CpG bien conocido en el estado de la técnica.

5 En efecto, se ha mostrado según la invención que la utilización del adyuvante CpG, y muy particularmente el adyuvante CpG en el que las uniones intracatenarias entre los nucleótidos consisten en unas uniones fosforotioato permitía la estimulación de la producción simultánea de anticuerpos de isotipos IgG y IgA, después de la administración sistémica.

10 Se refiere igualmente a una vacuna, mucosal o sistémica, caracterizada porque comprende, a título de principio activo, un producto inmunogénico tal como el definido anteriormente, en asociación con uno o varios excipientes, entre ellos los adyuvantes de inmunidad, fisiológicamente compatibles.

15 Las composiciones inmunogénicas o las vacunas según la presente invención encuentran su uso por ejemplo en el tratamiento tanto curativo como preventivo de los cánceres, en particular de los cánceres inducidos por unos virus como por ejemplo el ATL (Acute T cell leukemia) causado por el HTLV1, o el cáncer del cuello uterino causado por el papilomavirus, o también el linfoma de Burkitt o el sarcoma de Kaposi causados por unos virus de la familia herpes, respectivamente el Epstein-Barr (EBV) y el HHV8 así como en el tratamiento del SIDA, así como para prevenir o tratar las reacciones alérgicas.

20 Los productos inmunogénicos según la invención pueden ser utilizados de la siguiente manera:

25 Se administra a un paciente, en forma adaptada a la administración sistémica o mucosal, un producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos proteicos inmunogénicos según la presente invención, por ejemplo por vía intranasal, en cantidad suficiente para ser eficaz en el plano terapéutico, a un sujeto que necesita dicho tratamiento. La dosis administrada puede ir por ejemplo de 10 a 1000 µg por vía intranasal, una vez por semana durante dos meses, y después, dado el carácter transitorio de la respuesta de anticuerpo dirigida contra el antígeno de interés, periódicamente en función del índice de los anticuerpos séricos, por ejemplo cada 2-6 meses.

30 Se podrán administrar en una misma preparación dos o más productos inmunogénicos diferentes para inducir unos anticuerpos neutralizantes en todos los sitios funcionales nocivos en el caso en el que una sola molécula no lleva todos los sitios activos de la toxina o de la citoquina sobreproducida que se quiere neutralizar.

35 A título de medicamentos, los productos inmunogénicos de la invención pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas destinadas a una administración por vía sistémica o bien a una administración por la vía mucosa, en particular oro-mucosa, en particular la vía intranasal, la vía oral y la vía vaginal. La administración puede tener lugar en dosis única o repetida una o varias veces después de un cierto intervalo de tiempo.

40 Por eso, la presente invención tiene igualmente por objeto una composición farmacéutica, curativa o preventiva, caracterizada porque comprende, a título de principio activo, uno o varios productos inmunogénicos tales como los definidos anteriormente. El producto inmunogénico puede ser envasado solo o mezclado con un excipiente o mezcla de excipientes farmacéuticamente aceptables, tal como un adyuvante. Entre los excipientes destinados a la vía intranasal u oral, se consideran particularmente los caprilo caproil macrogol glicéridos, como el Labrasol[®] de la compañía GATTEFOSSE o el hidróxido de alúmina (Alhydrogel, Superfos, Dinamarca).

45 Para la administración oral según la invención, se asociará el principio activo a un adyuvante de inmunidad mucosal, tal como un mutante de CT, de LT o de CTB.

50 Se consideran muy particularmente las formas galénicas descritas por Boyaka *et al.* «Strategies for mucosal vaccine development» en Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(4), 1999, páginas 35-45. Se pueden citar también los microgránulos gastrorresistentes, en particular bioadhesivos tales como los descritos por Rojas *et al.* en Pharmaceutical Research, vol. 16, n° 2, 1999, página 255.

55 En unas condiciones particulares de aplicación, se considera una composición farmacéutica vacunal anterior, caracterizada porque comprende un adyuvante de inmunidad mucosal, tal como un mutante de CT (toxina de la cólera) o de LT (enterotoxina lábil de *E. coli*).

60 En otras condiciones particulares de aplicación, se considera una composición farmacéutica vacunal anterior, caracterizada porque contiene un adyuvante que absorbe el principio activo, tales como el hidróxido de alúmina o las partículas de oro.

65 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de una composición anteriormente descrita, caracterizado porque se mezcla, según unos métodos conocidos por sí mismos, el o los productos inmunogénicos activos con unos excipientes aceptables, en particular farmacéuticamente aceptables y, llegado el caso, con un adyuvante de inmunidad sistémica o mucosal.

En condiciones preferidas de aplicación del procedimiento anterior, se preparan unos microgránulos bioadhesivos y gastrorresistentes para la vía oral digestiva que contiene los principios activos inmunogénicos y, llegado el caso, los adyuvantes.

5 La presente invención se ilustra además por los ejemplos siguientes:

Ejemplos

Ejemplos de preparaciones de heterocomplejos:

10

Ejemplo 1: preparación del heterocomplejo KLH-VEGF murino

Se disuelven 0,58 mg de proteína KLH en 0,5 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de VEGF murino disuelto en 1 ml del mismo tampón.

15

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

20

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

La mezcla se trata entonces por formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 24 horas. Y después la reacción se bloquea mediante la adición de glicina 0.1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente.

25

Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

Ejemplo 2: Heterocomplejo KLH-VEGF humano.

30

Este heterocomplejo representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir principalmente en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan el VEGF humano.

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

35

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

40

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

La mezcla se trata entonces por formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 24 horas. Y después la reacción se bloquea mediante la adición de glicina 0.1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

45

Ejemplo 3: preparación de un heterocomplejo KLH-IL4 murino.

Se disuelven 0,841 mg de proteína KLH en 0,8 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de IL4 murino disuelto en 1 ml del mismo tampón.

50

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

55

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

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

60

Ejemplo 4: preparación de un heterocomplejo KLH-IL4 humano.

Este heterocomplejo representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir principalmente en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan el IL4 humano.

65

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

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

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

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

Ejemplo 5: preparación de un complejo KLH-IFN α .

15 Este conjugado representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir principalmente en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan la IFN α humana.

Se disuelven 0,625 mg de proteína KLH en 0,6 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de proteína IFN α humana disuelta en 1 ml del mismo tampón.

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

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

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

30 **Ejemplo 6: preparación de un complejo qp160-IFN α .**

Este heterocomplejo representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan al mismo tiempo la proteína de estructura gp160 del virus HIV-1 y la proteína IFN α citoquina inmunosupresora. Además, este heterocomplejo debe permitir inducir una reacción celular (quimioquinas, T auxiliar, CTL) dirigida contra las células infectadas que expresan la gp160.

35 Se disuelven 0,380 mg de proteína gp160 en 0,380 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de proteína IFN α humana disuelta en 1 ml del mismo tampón.

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

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

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

50 **Ejemplo comparativo 7: preparación de un heterocomplejo qp160-Tat toxoide. (La proteína Tat se inactiva de manera bioquímica)**

55 Este heterocomplejo representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan al mismo tiempo la proteína de estructura gp160 del virus HIV-1 y la proteína Tat extracelular del VIH-1. Además, este complejo debe permitir inducir la reacción celular (quimioquinas, T auxiliar, CTL) dirigida contra las células infectadas que expresan la gp160.

60 Se disuelven 0,550 mg de proteína gp120 en 0,550 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de proteína Tat toxoide disuelta en 1 ml del mismo tampón.

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

65 Después la reacción se bloquea mediante la adición de glicina 0,1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de glicina se elimina después mediante 3 diálisis sucesivas de 2 horas cada una en un tubo de diálisis cuyo

umbral de corte es de 3 kDa, a 4°C, contra 200 ml de tampón fosfato pH 7,6 10 mM.

Ejemplo comparativo 8: preparación de un heterocomplejo gp160-Tat GM. (La proteína Tat se inactiva de manera genética)

Este heterocomplejo representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan al mismo tiempo la proteína de estructura gp160 del virus HIV-1 y la proteína Tat de regulación del VIH-1. Además, este heterocomplejo debe permitir inducir la reacción celular (quimioquinas, T auxiliar, CTL) dirigida contra las células infectadas que expresan la gp160.

Se disuelven 0,550 mg de proteína gp160 en 0,550 ml de tampón fosfato 10 mM pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de proteína Tat GM disuelto en 1 ml del mismo tampón.

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

Después la reacción se bloquea mediante la adición de glicina 0,1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de glicina se elimina después mediante 3 diálisis sucesivas de 2 horas cada una en un tubo de diálisis cuyo umbral de corte es de 3 kDa, a 4°C, contra 200 ml de tampón fosfato pH 7,6 10 mM.

Ejemplo 9: Preparación de un heterocomplejo KLH-TNF α murino

Este conjugado representa el principio activo de una vacuna apropiada para inducir principalmente en el vacunado la producción de anticuerpos que neutralizan el TNF α murino.

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

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

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

La mezcla se trata entonces por formaldehído a la concentración final de 33 mM durante 48 horas. Después la reacción se bloquea mediante la adición de glicina 0.1 M final durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, la mezcla se dializa en las mismas condiciones que la diálisis efectuada anteriormente.

Ejemplo comparativo 10: Preparación de un heterocomplejo del péptido Tat (19-50) - μ IgE

El péptido de Tat (19-50) aporta unos epítopos auxiliares "helper".

Secuencia del péptido Tat utilizado:

Lys-Thr-Ala-Cys-Thr-Asn-Cys-Tyr-Cys-Lys-Lys-Cys-Cys-Phe-His-Cys-Gln-Val-Cys-Phe-Ile-Thr-Lys-Ala-Leu-Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly-Arg-Lys

Este conjugado representa el principio activo de un inmunógeno apropiado para inducir principalmente en el vacunado la formación de anticuerpos anti-IgE (humano).

Se disuelven 0,1 mg de péptido Tat (19-50) ($4,06 \times 10^{-8}$ moles) en 0,2 ml de tampón borato 10 mM, pH 8,5. Se añade a esta solución 1 mg de IgE humana ($6,6 \times 10^{-9}$ moles) disuelto en 1 ml del mismo tampón.

La mezcla así constituida se trata por glutaraldehído a la concentración final de 0,026 M durante 30 min. a la temperatura ambiente.

El exceso de glutaraldehído se elimina por 2 diálisis sucesivas de 4 horas y por 1 diálisis final de 16 horas contra un gran volumen de tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 que contiene el 0,8% de NaCl (PBS), a 4°C, utilizando una bolsa de diálisis con un umbral de corte a 10 kDa.

(relación péptido IgE = 50:1).

Ejemplo comparativo 11: Preparación de un heterocomplejo contra el fragmento del ricino

Este heterocomplejo constituye el principio activo de una vacuna apropiada para inducir en el vacunado la formación

de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el fragmento implicado en la fijación de la molécula de ricino, impidiéndole así ejercer su actividad tóxica.

5 A 0,5 mg de KLH ($1,1 \times 10^{-3}$ moles) disueltos en 0,5 ml de tampón fosfato de 10 mM, pH 8,2 se añade 1 mg ($3,3 \times 10^{-8}$ moles) de fragmento α del Ricino disuelto en 1 ml del mismo tampón. Esta mezcla se trata mediante glutaraldehído a la concentración final de 0,026 M durante 30 min. a temperatura ambiente.

10 El exceso de glutaraldehído se elimina después mediante diálisis sucesivas de 4 horas cada una y mediante 1 diálisis de 16 horas contra un gran volumen de tampón fosfato 10 mM, que contiene el 0,8% de NaCl (PBS) utilizando una bolsa de diálisis con un umbral de corte de 3 kDa.

(relación KLH:Ricino- α = 1:30).

15 Ejemplos de caracterizaciones bioquímicas de los heterocomplejos

A. Material y métodos de los ejemplos 12 a 23.

Las caracterizaciones bioquímicas de los heterocomplejos se han efectuado con la ayuda de las técnicas siguientes:

20 1. Ensayo de antigenicidad:

El estudio de la antigenicidad de un heterocomplejo con respecto a la antigenicidad de las proteínas que lo componen se efectúa por un ELISA indirecto clásico. Esta técnica permite medir cuantitativamente una proteína por reconocimiento específico de un anticuerpo contra un antígeno. Este ensayo consiste en depositar unas diluciones de una muestra que contiene la proteína buscada en los pocillos de una placa de microtitulación. Un anticuerpo policlonal específico reacciona con la proteína inmovilizada. Se añade después un segundo anticuerpo específico del primero, conjugado con la peroxidasa de rábano picante. El complejo formado se revela por incubación con OPD. El color amarillo obtenido es directamente proporcional a la cantidad de proteínas fijadas. La absorbancia (DO) de cada pocillo se mide con la ayuda de un lector de microplacas. La cantidad de proteína presente en la muestra se determina entonces con la ayuda de un intervalo de calibración.

2. Isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de una transferencia Western.

35 El isoelectroenfoque en gel de agarosa permite separar las moléculas en función de su punto isoeléctrico (pI) en unas condiciones no desnaturizantes, lo cual permite estudiar los heterocomplejos sin destruir las uniones débiles que existen dentro de estos complejos.

40 El isoelectroenfoque está seguido de una revelación por transferencia Western. Después de la separación electroforética, las moléculas son transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa por capilaridad. Estas moléculas son después caracterizadas por inmunológica.

3. Medición del porcentaje de moléculas de antígeno de interés unidas a la molécula proteica portadora por un enlace covalente (Primer procedimiento)

45 La estimación del porcentaje de las moléculas de antígeno de interés unidas a las moléculas proteicas portadoras por un enlace covalente en un producto inmunogénico se efectúa por ejemplo por tamizado molecular sobre una columna que contiene Superdex 200, en unas condiciones desnaturizantes (urea 8M) y reductoras (beta-mercaptoetanol al 5%).

50 El porcentaje de moléculas de antígeno de interés unidas por un enlace covalente se deduce de la cantidad de antígeno de interés (determinada por un ELISA indirecto clásico) presente en el volumen de exclusión de la columna. En efecto, la molécula proteica portadora, tal como la KLH, que tiene una masa molecular más importante que el límite superior de fraccionamiento de la columna utilizada (200 kDa en nuestro caso), sale en el volumen de exclusión de esta columna. Así, en unas condiciones desnaturizantes y reductoras, sólo los antígenos de interés unidos de manera covalente a la molécula proteica portadora salen en el volumen de exclusión.

4. Medición del porcentaje de las moléculas de antígeno de interés unidas a la molécula portadora por un enlace covalente (segundo procedimiento)

60 El porcentaje de citoquina fijada sobre la proteína portadora (KLH) se ha determinado por una ELISA doble sándwich, con la ayuda de un anticuerpo de captura dirigido específicamente contra la proteína portadora.

65 Se fijan 100 μ l de anticuerpos policlonales de caballo dirigidos contra la KLH (1 mg/ml) diluidos en un tampón fosfato 10 mM pH 7,3 NaCl 150 mM (PBS) en pocillos de una placa de microtitulación (high-binding; Costar) durante 2 horas a 37°C. Después de 3 lavados en PBS/0,1% Tween 20 (PBST), los pocillos son saturados con PBS que contiene el 2% de SVF.

Después de 1h 30 de saturación, los pocillos se lavan 3 veces con PBST, después se añaden en los pocillos unas diluciones de 2 en 2 de heterocomplejo (10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 y 0,156 µg/ml), realizadas en duplicado (100 µl/pocillo).

5 Después de 2 horas de incubación, los pocillos se lavan 3 veces con el PBST. El tween, agente disociante, presente en el tampón de lavado, permite eliminar cualquier molécula no fijada de manera covalente sobre la KLH que está fijada específicamente sobre el anticuerpo de captura.

10 Después, las dos diluciones de heterocomplejo son tratadas de 2 maneras diferentes.

- a) la primera serie se incuba con un anticuerpo dirigido contra la KLH.
- b) la segunda serie está incubada con un anticuerpo dirigido contra la citoquina.

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

20 La cantidad de KLH fijada por el anticuerpo de captura y después la cantidad de molécula de citoquina fijada sobre la KLH de manera covalente se calculan con la ayuda de curvas de calibración realizadas por ELISA.

25 Se determina entonces el porcentaje de citoquina fijado de manera covalente a la KLH.

Ejemplo 12: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-VEGF murino

1. La antigenicidad

30 El heterocomplejo KLH-VEGF murino presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad del VEGF murino.

2. Isoelectroenfoque en gel de agarosa seguido de una transferencia Western.

35 La figura 1 muestra que el heterocomplejo KLH-VEGF murino migra en forma de una sola banda a un pl diferente de las moléculas nativas que lo constituyen.

Ejemplo 13: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-VEGF humano

1. Antigenicidad

40 El heterocomplejo KLH-VEGF humano presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad del VEGF humano.

2. Isoelectroenfoque seguido de una transferencia Western.

45 La figura 2 muestra que el heterocomplejo KLH-VEGF humano migra en forma de una sola banda a un pl diferente de las moléculas nativas que lo constituyen. La muestra de VEGF humano se ha depositado en tres sitios diferentes con el fin de mostrar que migra siempre al mismo sitio.

Ejemplo 14: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-IL4murino

50 *1. Antigenicidad*

El heterocomplejo KLH-IL4 murino presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la IL4 murino.

Ejemplo 15: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-IL4 humano

1. Antigenicidad

55 El complejo KLH-IL4 humano presenta una antigenicidad igual a la antigenicidad de la proteína IL4 humana.

60 *2. Isoelectroenfoque seguido de una transferencia Western.*

La figura 3 muestra que el heterocomplejo KLH-IL4 humano migra en forma de una sola banda a un pl diferente de las moléculas nativas que lo constituyen.

65

Ejemplo 16: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-IFN α

1. Antigenicidad

5 El complejo KLH-IFN α humano presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la IFN α humana.

2. Estimación del porcentaje de las moléculas de antígeno de interés unidas a la molécula proteica portadora por un enlace covalente.

10 La preparación KLH-IFN α se ha pasado sobre una columna superdex S200 según las condiciones descritas anteriormente. El pico fuera del volumen de exclusión se ha recogido, dializado y después liofilizado. La concentración en antígeno de interés se ha determinado mediante la técnica de ELISA indirecta. La cantidad de IFN α encontrada en el volumen excluido es de 30 μ g mientras que 1000 μ g de IFN han sido utilizados para preparar el producto inmunogénico, sin pérdida medible de antígeno durante el procedimiento de preparación. El porcentaje de moléculas de antígeno de interés unidas a la molécula KLH por un enlace covalente en el producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos KLH-IFN α puede por lo tanto ser estimado en aproximadamente el 3%.

Ejemplo 17: Caracterización bioquímica del heterocomplejo gp160-IFN α

20 *1. Antigenicidad*

El complejo gp160-IFN α humano presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la proteína gp160 así como a la de la IFN α humana.

25 *2. Isoelectroenfoque seguido de una transferencia Western.*

La figura 4 muestra que el heterocomplejo gp160-IFN α humano migra en forma de una sola banda a un pl que es muy diferente del pl de la proteína gp160 recombinante que lo constituye. El pl de este heterocomplejo es ligeramente inferior al de la IFN α .

30

Ejemplo comparativo 18: Caracterización bioquímica del heterocompleto qp160-Tat toxoide

1. Antigenicidad

35 El complejo gp160-Tat Toxoide presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la proteína gp160 y a la de la proteína Tat.

Ejemplo comparativo 19: Caracterización bioquímica del heterocomplejo qp160-Tat GM

40 *1. Antigenicidad*

El complejo gp160-Tat GM presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la proteína gp160 y a la de la proteína Tat.

45 **Ejemplo 20: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-IL4 murino**

1. Antigenicidad

El heterocomplejo KLH-IL4 murino presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la IL4 murino.

50

2. Estimación del % de moléculas de antígenos de interés fijadas de manera covalente a la molécula proteica portadora.

El 11% de moléculas de IL4 murino son fijadas de manera covalente a la KLH.

55

Ejemplo 21: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-IFN α

1. Antigenicidad

60 El complejo KLH-IFN α humano presenta una antigenicidad idéntica a la antigenicidad de la IFN α humana.

2. Estimación del % de moléculas de antígenos de interés fijadas de manera covalente a la molécula proteica portadora.

65 El 8% de moléculas de IFN α humana son fijadas de manera covalente a la KLH.

Ejemplo comparativo 22: Caracterización bioquímica del heterocomplejo péptido Tat_hIgE

5 *1. Antigenicidad*

El complejo péptido Tat_hIgE presenta una antigenicidad comparable a la de la IgE humana.

Ejemplo comparativo 23: Caracterización bioquímica del heterocomplejo KLH-Ricino-β

10 *1. Antigenicidad*

El complejo KLH-Ricino-β presenta una antigenicidad comparable a la del fragmento β del Ricino.

15 *2. Isoelectroenfoque seguido de una transferencia Western*

El complejo migra en forma de una banda única y la presencia del fragmento β se ha puesto en evidencia mediante la transferencia Western.

Ejemplos de actividad inmunogénica de los heterocomplejos

20 **Ejemplo 24: actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-VEGF murino**

A. Material y métodos

25 La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-VEGF murino con respecto a la de VEGF murino se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

1- Inmunización

30 En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 8 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 μg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 μg en AIF.

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2; 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

35 Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

40 Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (50 μg) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o Tétanos toxoide.

45 B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro

50 Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-VEGF murino como por VEGF murino únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 μg/ml de KLH-VEGF murino no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 μg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

55 *2- Respuesta humoral*

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra VEGF murino, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La figura 5 representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

60 Los ratones inmunizados con la preparación KLH-VEGF murino presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG más importantes que los de los ratones inmunizados con el VEGF murino únicamente.

65 La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con la ayuda del ensayo de actividad biológica de

VEGF, factor de crecimiento selectivo de las células endoteliales. Unas células endoteliales (HUVECs) son cultivadas en pocillos de fondo plano de una placa de microcultivo a razón de 3000 células por pocillo. Se han agrupado los sueros de cada grupo de ratones. Diferentes diluciones de estas muestras de sueros (1/100 - 1/800) extraídos el D-2 y D72 han sido pre-incubadas durante 2 horas con 20 ng/ml de VEGF murino y después depositadas sobre células endoteliales. El cultivo celular se prosigue a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 3 días. 18 horas antes del final de la incubación, se añaden 0,5 µCi de timidina tritiada/pocillo. Los sueros neutralizantes impiden al VEGF murino inducir la proliferación de las células endoteliales, mientras que los sueros no neutralizantes permiten la proliferación de estas células. Los resultados son dados en porcentaje de neutralización. La figura 6 presenta los resultados obtenidos.

Los anticuerpos inducidos por el complejo tienen un poder neutralizante más importante que el inducido por VEGF murino.

Ejemplo 25: Actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-VEGF humano

A. Material y métodos

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-VEGF humano con respecto a la de VEGF humano se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

1- Inmunización

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 8 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 µg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 µg en AIF.

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (50 µg) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-VEGF humano como por VEGF humano únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 µg/ml de KLH-VEGF humano no disminuye la proliferación de los linfocitos.

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 µg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra VEGF humano, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La figura 7 representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

Los ratones inmunizados con la preparación KLH-VEGF humano presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG más importantes que los de los ratones inmunizados con el VEGF humano únicamente.

La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con la ayuda del ensayo de actividad biológica de VEGF, factor de crecimiento selectivo de las células endoteliales. Unas células endoteliales (HUVECs) son cultivadas en pocillos de fondo plano de una placa de microcultivo a razón de 3000 células por pocillo. Se han agrupado los sueros de cada grupo de ratones. Diferentes diluciones de estas muestras de sueros (1/100 - 1/800) extraídas el D-2 y D72 son pre-incubadas durante 2 horas con 20 ng/ml de VEGF humano y después depositadas sobre células endoteliales. El cultivo celular se prosigue a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 3 días. 18 horas antes del final de la incubación, se añaden 0,5 µCi de timidina tritiada/pocillo. Los sueros neutralizantes impiden al VEGF humano inducir la proliferación de las células endoteliales, mientras que los sueros

no neutralizantes permiten la proliferación de estas células. Los resultados son dados en porcentaje de neutralización. La figura 8 presenta los resultados obtenidos.

Los anticuerpos inducidos por el complejo tienen un poder neutralizante más importante que el inducido por VEGF humano.

Ejemplo 26: Actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-IL4 murino

A. Material y métodos

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-IL4 murino con respecto a la de la IL4 murino se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

1- Inmunización

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 8 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 µg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 µg en AIF.

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección del D-2 al D72. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

14 días después de la última inmunización, los ratones control y los ratones inmunizados con KLH-IL4 murino se pusieron a prueba con polen de abedul en presencia de alumbre (100 µg/ratones) por vía subcutánea el D74, D95 y D109. Se efectúan regularmente unas extracciones sanguíneas para seguir la aparición de anticuerpos de clase G y E dirigidos contra Bet v 1, alérgeno mayor del polen de abedul.

2- Toxicidad

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (50 µg) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo *in vivo* e *in vitro*

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-IL4 murino como por la IL4 murino únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 µg/ml de KLH-IL4 murino no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 µg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la IL4 murino, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La figura 9 representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

Los ratones inmunizados con la preparación KLH-IL4 murino presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG más importantes que los de los ratones inmunizados con la IL4 murino únicamente.

La actividad neutralizante de estos anticuerpos presentes en los ratones inmunizados con la preparación KLH-IL4 murino se ha medido con la ayuda del ensayo de actividad biológica de la IL4 murino. Este ensayo utiliza las células HT-2, líneas celulares murinas cuyo crecimiento es IL4 murino-dependiente (Watson, J. 1979. J. Exp. Med. 150:1510.). Unas células HT-2 son cultivadas en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 10 000 células por pocillo. Unos sueros diluidos al 1/50 extraídos el D-2 y D72 son pre-incubados durante 2 horas con 50 ng/ml de IL4 murino y después depositados sobre las células HT-2. El cultivo celular se prosigue a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO2 durante 3 días. 4 horas antes del final de la incubación, se añaden 0,5 µCi de timidina tritiada/pocillo. Los sueros neutralizantes impiden a la IL4 murina inducir la proliferación de las células HT-2, mientras que los sueros no neutralizantes permiten la proliferación de estas células. Los resultados son dados en porcentaje de neutralización. La figura 10 presenta los resultados obtenidos.

Los anticuerpos inducidos por el complejo son neutralizantes.

Además, estos anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la IL4 murino impiden la producción, por estos ratones, de anticuerpos de tipo IgE dirigidos contra Bet v 1, cuando estos últimos son puestos a prueba con polen de abedul. La figura 11 muestra bien que los ratones inmunizados con KLH-IL4 murino que posee IgG neutralizantes dirigidos contra la IL4 murina bloquean la producción de IgE dirigidos contra Bet v 1 y empiezan a producir unos anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra Bet v 1. Por el contrario, los ratones que no han recibido KLH-IL4 murino, y que por lo tanto no tienen anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra IL4, producen únicamente unos anticuerpos de tipo IgE dirigidos contra Bet v 1.

Ejemplo 27: Actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-IL4 humano

A. Material y métodos

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-IL4 humano con respecto a la de la IL4 humano se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

1- Inmunización

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 µg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 µg en AIF.

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (50 µg) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-IL4 humano como por IL4 humano únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 µg/ml de KLH-IL4 humano no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 µg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra IL4 humano, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3).

Tabla 1

	Título	
	D-2	D72
ratones control:		
ratón control 1	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 2	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 3	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratones inmunizados con IL4 humana:		
ratón 4	<500 ⁻¹	32 000 ⁻¹
ratón 5	<500 ⁻¹	48 000 ⁻¹
ratón 6	<500 ⁻¹	16 000 ⁻¹
ratones inmunizados con el complejo KLH-IL4 humano		
ratón 7	<500 ⁻¹	256 000 ⁻¹
ratón 8	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹
ratón 9	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹

Los ratones inmunizados con la preparación KLH-IL4 humano presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG más importantes que los de los ratones inmunizados con el IL4 humano únicamente.

5 La actividad neutralizante de estos anticuerpos inducida por la preparación KLH-IL4 humana se ha medido con la ayuda del ensayo de actividad biológica de la IL4 humana. Este ensayo utiliza las células TF-1, línea celular humana cuyo crecimiento es IL4 humano-dependiente (Kitamura, T. y *al.*, 1989. J. Cell Physiol. 140:323-34). Se cultivan unas células TF-1 en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 10 000 células por pocillo. 10 Unos sueros diluidos al 1/50 extraídos el D-2 y D72 pre-incubados durante 2 horas con 50 ng/ml de IL4 humano son después depositados sobre las células TF-1. El cultivo celular se prosigue a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO2 durante 3 días. 4 horas antes del final de la incubación, se añaden 0,5 µCi de timidina tritiada/pocillo. Los sueros neutralizantes impiden a IL4 humano inducir la proliferación de las células TF-1, mientras que los sueros no neutralizantes permiten la proliferación de estas células. Los resultados son dados en porcentaje de neutralización. La figura 12 presenta los resultados obtenidos.

15 Los anticuerpos inducidos por el complejo son neutralizantes.

Ejemplo 28: Actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-IFNα

20 A. Material y métodos

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-IFNα humana con respecto a la de la IFNα humana se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

25 *1- Inmunización*

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 µg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 µg en AIF.

30 Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

35 *2- Toxicidad*

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (100 µg) según la farmacopea.

40 Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

45 *1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro*

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-IFNα humana como por la IFNα humana únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 µg/ml de KLH-IFNα humana no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

50 Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 100 µg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

55 La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la IFNα humana, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La tabla 2 representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

60 TABLA 2

	Título	
	D-2	D72
Ratones control:		
Ratón control 1	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
Ratón control 2	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹

Ratón control 3	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
Ratones inmunizados con IFN α :		
Ratón 4	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
Ratón 5	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹
Ratón 6	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
Ratones inmunizados con el complejo KLH-IFN α :		
Ratón 7	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
Ratón 8	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
Ratón 9	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹

Los ratones inmunizados con la preparación KLH-IFN α humana presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG equivalentes a los de los ratones inmunizados con IFN α humana únicamente.

- 5 La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con la ayuda del ensayo de actividad biológica de la IFN α humana. (Rubinstein S, J Viral, 1981,755-8). Este ensayo de medición de efecto antiviral tiene como objetivo evaluar la inhibición de la lisis de células MDBK por el VSV (Vesicular Stomatitis virus) en presencia de IFN. Se cultivan unas células MDBK en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 350 000 células por pocillo. Diferentes diluciones de sueros (1/100 al 1/800) extraídas el D-2 y D72 son pre-incubadas durante 2 horas con 5 ng/ml de IFN α humana y después depositadas sobre las células MDBK. Después de 20 horas de cultivo celular realizado a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂, los sueros diluidos presentes en los pocillos son retirados, las células lavadas y después se añaden 100 μ l que contienen 100 DL50 (dosis letal al 50%) de virus VSV. 18 horas después de la adición del virus, se mide el efecto lítico del virus. Los sueros neutralizantes permiten al VSV lisar las células, mientras que los sueros no neutralizantes impiden esta lisis. Los resultados son dados en porcentaje de neutralización.

TABLA 3

ratones inmunizados con IFN α :				
	1/100	1/200	1/400	1/800
ratón 4 D-2	0	0	0	0
D72	100	75	65	50
ratón 5 D-2	0	0	0	0
D72	100	67	60	55
ratón 6 D-2	0	0	0	0
D72	100	72	65	60
ratones inmunizados con el conjugado KLH-IFN α :				
	1/100	1/200	1/400	1/800
ratón 7 D-2	0	0	0	0
D72	100	100	100	100
ratón 8 D-2	0	0	0	0
D72	100	100	100	100
ratón 9 D-2	0	0	0	0
D72	100	100	100	100

- 20 Los anticuerpos inducidos por el complejo tienen un poder neutralizante más importante que el inducido por la IFN α humana. Los resultados son dados en % de neutralización.

Ejemplo 29: Actividad inmunogénica del heterocomplejo gp160-IFN α

25 A. Material y métodos

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación gp160-IFN α humana con respecto a la de la IFN α humana se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

30 *1- Inmunización*

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 μ g) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 μ g en AIF.

- 35 Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (100 µg) según la farmacopea.

- 5 Se evalúa la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo *in vitro* mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

10 1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo *in vivo* e *in vitro*

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de gp160-IFN humana como por la IFNα humana únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 µg/ml de gp160-IFNα humana no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

- 15 Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 100 µg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

- 20 La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la IFN humana, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3).

25 TABLA 4

	Título	
	D-2	D72
Ratones control:		
ratón control 1	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 2	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 3	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratones inmunizados con IFNα:		
ratón 4	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹
ratón 5	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
ratón 6	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹
ratones inmunizados con el complejo gp 160-IFNα:		
ratón 7	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
ratón 8	<500 ⁻¹	96 000 ⁻¹
ratón 9	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹

Los ratones inmunizados con la preparación gp160-IFNα humana presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG equivalentes a los de los ratones inmunizados con la IFNα humana únicamente.

- 30 La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con la ayuda del ensayo de actividad biológica de la IFNα humana descrito en el ejemplo anterior. Los resultados son dados en % de neutralización.

35 TABLA 5

ratones inmunizados con IFNα:		1/100	1/200	1/400	1/800
ratón 4 D-2		0	0	0	0
	D72	100	80	70	53
ratón 5 D-2		0	0	0	0
	D72	100	70	65	50
ratón 6 D-2		0	0	0	0
	D72	100	65	60	57
ratones inmunizados con el conjugado gp160-IFNα:		1/100	1/200	1/400	1/800
ratón 7 D-2		0	0	0	0
	D72	100	100	100	100
ratón 8 D-2		0	0	0	0
	D72	100	100	100	100
ratón 9 D-2		0	0	0	0
	D72	100	100	100	100

Los anticuerpos inducidos por el complejo tienen un poder neutralizante más importante que el inducido por la IFN α humana.

5 **Ejemplo comparativo 30: Actividad inmunogénica del heterocomplejo gp160-Tat toxoide**

A. Material y métodos

10 La actividad inmunogénica (humoral y celular) de la preparación gp160-Tat toxoide con respecto a la de Tat toxoide se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

1- Inmunización

15 En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 μ g) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 μ g en AIF.

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

20 Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

25 Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (100 μ g) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

30 *1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro*

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de gp160-Tat toxoide como por Tat toxoide únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 μ g/ml de gp160-Tat toxoide no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 100 μ g del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

40 *2- Respuesta humoral*

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la Tat, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La tabla 1 representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

45

TABLA 6

	Título	
	D-2	D72
ratones control:		
ratón control 1	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 2	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 3	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratones inmunizados con el Tat toxoide:		
ratón 4	<500 ⁻¹	48 000 ⁻¹
ratón 5	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹
ratón 6	<500 ⁻¹	48 000 ⁻¹
ratones inmunizados con el conjugado gp160-Tat toxoide:		
ratón 7	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹
ratón 8	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹
ratón 9	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹

50 Los ratones inmunizados con la preparación de gp160-Tat toxoide presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG anti-Tat más importantes que los de los ratones inmunizados con la Tat toxoide únicamente.

La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con la ayuda del ensayo Cat. Diferentes diluciones de sueros (1/100 - 1/800) extraídas el D-2 y D72 son incubadas durante 2 horas con 50 ng/ml de Tat nativa. Estas diluciones son después depositadas sobre unas células HeLa, células transfectadas de manera estable con un plásmido que contiene LTR del VIH-1 como promotor del gen Cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Después de 24 horas de cultivo, las células son lisadas y la cantidad de proteína CAT producida se mide mediante un ensayo ELISA, el ensayo Cat, (Boehringer Mannheim). Los sueros neutralizantes impiden a la proteína Tat inducir la expresión de la proteína CAT, mientras que los sueros no neutralizantes permiten la síntesis de esta proteína CAT. Los resultados son dados en % de neutralización.

TABLA 7

ratones inmunizados con la Tat toxoide:				
	1/100	1/200	1/400	1/800
ratón 4 D-2	0	0	0	0
D72	60	50	25	20
ratón 5 D-2	0	0	0	0
D72	60	55	30	20
ratón 6 D-2	0	0	0	0
D72	65	50	30	30
ratones inmunizados con el conjugado gp160-Tat toxoide:				
	1/100	1/200	1/400	1/800
ratón 7 D-2	0	0	0	0
D72	100	100	100	100
ratón 8 D-2	0	0	0	0
D72	100	100	100	100
ratón 9 D-2	0	0	0	0
D72	100	100	100	100

Los anticuerpos inducidos por el conjugado gp160-Tat toxoide tienen un poder neutralizante más importante que el inducido por la Tat toxoide.

2. Producción de MIP1 α

La producción de MIP1 α en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos. Los esplenocitos de ratones inmunizados y de ratones control son aislados y después cultivados en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 100 000 células/pocillos en presencia de 5 μ g/ml de p24, de gp160, de Tat nativa y de una mezcla de 5 μ g/ml gp160 y de 5 pg/ml de Tat nativa. Los sobrenadantes son extraídos después de 24 horas de cultivo y la presencia de MIP1 en los sobrenadantes se mide con la ayuda de un ensayo ELISA de R&D. Los resultados son expresados en pg/ml.

TABLA 8

Gp160	Tat nativa	gp160 + Tat nativa	p24
Ratones control:			
Ratón 1 D72	MIP1a 95	90	145 9
Ratón 2 D72	MIP1a 100	90	136 7
Ratón 3 D72	MIP1a 120	110	132 9
Ratón inmunizados por la Tat toxoide:			
Ratón 4 D72	MIP1a 145	130	190 7
Ratón 5 D72	MIP1a 128	145	225 9
Ratón 6 D72	MIP1a 150	230	295 10
Ratón inmunizados por el conjugado gp160-Tat toxoide			
Ratón 7 D72	MIP1a 875	736	1725 9
Ratón 8 D72	MIP1a 945	905	1900 7
Ratón 9 D72	MIP1a 1025	795	1755 8

Los esplenocitos de los ratones inmunizados con el conjugado gp160-Tat toxoide producen más quimiocinas MIP1 α que las células de los ratones inmunizados por la Tat toxoide únicamente cuando están activadas, *in vitro*, por los inmunógenos utilizados durante la inmunización.

4. Proliferación de los esplenocitos de ratón inmunizados (Ensayo CMI)

Los esplenocitos de los ratones inmunizados y de los ratones control son aislados y después cultivados en unos pocillos de fondo redondo de una placa de microcultivo a razón de 100 000 células/pocillo en presencia de p24, de gp160, de Tat nativa y de una mezcla de gp160 y de Tat nativa. El cultivo celular se prosigue a 37°C en atmósfera

húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 6 días. 18 horas antes del final de la incubación, se añaden 0,5 µCi de timidina tritiada/pocillo. La intensidad de la respuesta inmunitaria es proporcional al índice de proliferación I_p.

I_p = cpm (golpe por minuto) para el antígeno dado/cpm control

5

TABLA 9

		Gp160 Tat nativa	gp160 + Tat nativa	p24
Ratones control:				
Ratón 1	D72	1,1	1,1	1
Ratón 2	D72	1	1,1	1,1
Ratón 3	D72	1,2	1	1
Ratón inmunizados con la Tat toxoide				
Ratón 4	D72	1,2	8	10
Ratón 5	D72	1	9	9
Ratón 6	D72	1	10	9
Ratón inmunizados con el conjugado gp160-Tat toxoide:				
Ratón 7	D72	9	11	8
Ratón 8	D72	10	9	7,5
Ratón 9	D72	10,5	9	8

10 Los esplenocitos de los ratones inmunizados con el conjugado gp160-Tat toxoide o el Tat toxoide, proliferan cuando están activadas, *in vitro*, con los inmunógenos utilizados durante la inmunización.

Ejemplo comparativo 31: Actividad inmunogénica del heterocomplejo gp160-TatGM

A. Material y métodos

15

La actividad inmunogénica (humoral y celular) de la preparación gp160-Tat GM con respecto a la de Tat toxoide se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

1- Inmunización

20

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 µg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 µg en AIF.

25

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

30

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (100 µg) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

35

B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo *in vivo* e *in vitro*

40

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de gp160-Tat GM como por Tat toxoide únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 µg/ml de gp160-Tat toxoide no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

45

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 100 µg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

50

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la Tat, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La tabla 1 representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

TABLA 10

	Título	
	D-2	D72
ratones control:		
ratón control 1	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 2	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón control 3	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratones inmunizados con la Tat GM		
ratón 4	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹
ratón 5	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹
ratón 6	<500 ⁻¹	48 000 ⁻¹
ratones inmunizados con el conjugado gp160-Tat GM		
ratón 7	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹
ratón 8	<500 ⁻¹	128 000 ⁻¹
ratón 9	<500 ⁻¹	64 000 ⁻¹

5 Los ratones inmunizados con la preparación de gp160-Tat GM presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG anti-Tat más importantes que los de los ratones inmunizados con la Tat GM únicamente.

Ejemplo 32: Actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-TNF α murino

Material y métodos

10 La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-TNF α murino con respecto a la de TNF α murino se ha estudiado en el ratón balb/c de 18-20 g.

15 En el día 0, un grupo de 3 ratones (grupo A) recibe una inyección de 0,1 ml de una emulsión en AIF por vía intramuscular que contiene 60 μ g del heterocomplejo KLH-TNF α . Una inyección de recuerdo de 30 μ g y de 15 μ g en AIF se da respectivamente el D21 y el D60. 3 ratones control reciben una dosis equivalente en TNF α murino según el mismo protocolo (grupo B).

20 En el día 0, un grupo de 3 ratones (grupo C) recibe una inyección 0,1 ml de una emulsión en AIF por vía intramuscular que contiene 60 μ g del heterocomplejo KLH-TNF α murino y 30 μ g del oligodesoxinucleótido fosforotioato 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' (CpG DNA: 1826). Una inyección de recuerdo de 30 μ g y de 15 μ g de heterocomplejo KLH-TNF α murino en AIF se da respectivamente el D21 y el D60. 3 ratones control reciben una dosis equivalente en TNF α murino según el mismo protocolo (grupo D).

25 Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

30 Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humanas (50 μ g) según la farmacopea.

35 Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro

40 Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-TNF α murino como por TNF α murino únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 μ g/ml de KLH-TNF α murino no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

45 Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 μ g del heterocomplejo con o sin CpG DNA 1826 manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

50 La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra TNF α murino, determinada por ELISA y expresada en título. La presencia de anticuerpos de tipo IgA dirigidos contra TNF α murino en las secreciones vaginales también ha sido determinada por ELISA y expresada en título. El título representa la

inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3. La tabla siguiente representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

TABLA 11

5

	IqA vaginal			
	D-2	D72	D-2	D72
Ratones inmunizados con KLH-TNF α murino (grupo A)				
1	< 500 ⁻¹	64 000 ⁻¹	< 10 ⁻¹	20 ⁻¹
2		48 000 ⁻¹		20 ⁻¹
3		64 000 ⁻¹		40 ⁻¹
Ratones inmunizados con TNF α murino (grupo B)				
4	< 500 ⁻¹	750 ⁻¹	< 10 ⁻¹	10 ⁻¹
5		1 000 ⁻¹		20 ⁻¹
6		750 ⁻¹		10 ⁻¹
Ratones inmunizados con KLH-TNF α murino en presencia de CpG (grupo C)				
7	< 500 ⁻¹	128 000 ⁻¹	< 10 ⁻¹	160 ⁻¹
8		256 000 ⁻¹		80 ⁻¹
9		256 000 ⁻¹		320 ⁻¹
Ratones inmunizados con el TNF α murino en presencia de CpG (grupo D)				
7	< 500 ⁻¹	2 000 ⁻¹	< 10 ⁻¹	20-1
8		4 000 ⁻¹		40 ⁻¹
9		3 000 ⁻¹		40 ⁻¹

Ejemplo comparativo 33: Actividad inmunogénica del heterocomplejo de péptido de Tat_nIgE

A. Material y métodos

10

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-IgE humana con respecto a la de la IgE humana se ha estudiado en el ratón balb/c de 18-20 g.

1- Inmunización

15

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 μ g) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 μ g en AIF.

20

Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

2- Toxicidad

25

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (50 μ g) según la farmacopea.

Se evalúa *in vitro* la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

30

B. Resultados:

1- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo y in vitro.

35

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-IgE humana como por la IgE humana únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 μ g/ml de KLH-IgE humana no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

40

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 μ g del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días siguientes a la inyección.

2- Respuesta humoral

45

La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la IgE humana, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3). La tabla siguiente representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

TABLA 12

	Título	
	D-2	D72
Ratones control		
1	< 500 ⁻¹	< 500 ⁻¹
2		
3		
Ratones inmunizados con hIgE		
4	< 500 ⁻¹	64 000 ⁻¹
5		128 000 ⁻¹
6		128 000 ⁻¹
Ratones inmunizados con KLH-hIgE		
7	< 500 ⁻¹	256 000 ⁻¹
8		128 000 ⁻¹
9		256 000 ⁻¹

- 5 Los ratones inmunizados con la preparación KLH-hIgE presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG ligeramente superiores a los de ratones inmunizados con la preparación de hIgE.

Ejemplo comparativo 34: Actividad inmunogénica del heterocomplejo KLH-ricino-β

10 A. Material y métodos

La actividad inmunogénica (humoral) de la preparación KLH-ricino-β con respecto a la del fragmento β del ricino se ha estudiado en el ratón balb/c de 18-20 g.

15 *1- Inmunización*

En el día 0, 7, 14, 21 un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,1 ml (10 μg) de una emulsión en AIF por vía intramuscular. El D60 se da una inyección de recuerdo de 5 μg en AIF.

- 20 Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección el D-2. 3 ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

25 *2- Toxicidad*

Se busca la toxicidad anormal en 3 ratones que reciben 1 dosis humana (50 μg) según la farmacopea.

- 30 Se evalúa in vitro la ausencia de inmunotoxicidad del heterocomplejo mediante un ensayo de proliferación celular realizado sobre PBMC cultivadas en presencia del complejo y estimuladas mediante PPD o del Tétanos toxoide.

B. Resultados:

35 *3- Ausencia de toxicidad del heterocomplejo in vivo e in vitro*

Los ratones inmunizados tanto por la preparación de KLH-ricino-humana como por fragmento β del ricino únicamente no presentan ninguna señal clínica ni ninguna lesión anatómica. El ensayo de inmunosupresión muestra que unas dosis de 100 ng/ml con 1 μg/ml de KLH-ricino-β no disminuyen la proliferación de los linfocitos.

- 40 Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 50 μg del heterocomplejo manifiesta signos de toxicidad (temperatura, trastornos cutáneos, manifestaciones sistémicas o regionales) durante los 7 días tras la inyección.

2- Respuesta humoral

- 45 La respuesta humoral se mide por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra fragmento β del ricino, determinada por ELISA y expresada en título (inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3) La tabla siguiente representa los títulos en anticuerpos obtenidos.

TABLA 13

	Título	
	D-2	D72
Ratones control		
1	< 500 ⁻¹	< 500 ⁻¹
2		
3		
Ratones inmunizados con ricino-β		
4	< 500 ⁻¹	256 000 ⁻¹
5		512 000 ⁻¹
6		256 000 ⁻¹
Ratones inmunizados con KLH-ricino-β		
7	< 500 ⁻¹	256 000 ⁻¹
8		256 000 ⁻¹
9		128 000 ⁻¹

5 La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha verificado mediante la inyección en el ratón de mezclas de suero anti-ricino-β y de ricino que no han conllevado la muerte del animal, a la inversa de lo que se ha observado durante la administración al ratón de mezclas de ricino y de suero normal.

Referencias

10 Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. J Urol 1999; 161:182-7

15 Aucouturier J *et al.*, Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 2001 19:2666-72

Baras B. *et al.*, Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a Schistosoma mansoni antigen. Infect Immun. (1999) 67:2643-8)

20 Basak A, Boudreault A, Chen A, Chretien M, Seidah NG, Lazure C., Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the production of prohormone convertases antibodies: synthesis, characterization and use of 8-branched immunogenic peptides.: J Pept Sci 1995 Nov-Dec; 1(6):385-95

25 Cowan *et al.*, Induction of TNF alpha in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus Type 1 Tax1, Journal of virology, 1997, 6982-6989.

Ferreira FK *et al.*, 1993, Purification and characterization of recombinant Bet v1, the major Birch pollen allergen: immunological equivalence to natural Bet v1; J. Biol. Chem., 268: 19574.

30 Fouts TR, Tuskan R, Godfrey K, Reitz M, Hone D, Lewis GK, DeVico AL. Expression and characterization of a single-chain polypeptide analogue of the human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 receptor complex. J. Virol. diciembre de 2000, 74(24): 11427-36.

35 Fouts T. Godfrey K, Bobb K, Montefiori D, Hanson CV, Kalyanaraman VS, DeVico A, Pal R. Cross-linked HIV-1 envelop-CD4 receptor complexes elicit broadly cross-reactive neutralizing antibodies in rhesus macaques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 3 de septiembre; 99(18):11842-7. Epub 21 de agosto de 2002.

Le Buanec *et al.*, HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression. and angiogenic processes. Biomed Pharmacother. 1999; 53: 424-31.

40 Morgenstern JP *et al.*, Amino acid sequence of Fel d1, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning., PNAS, 1991,88: 9690

Mori N *et al.*, Interleukine-10 gene expression in adult t-cell leukaemia, Blood, 1996, 1035-45.

45 Sementchenko VI, Schweinfest CW, Papas TS, Watson DK., ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. Oncogene 1998; 17:2883-8

Tovey ER *et al.*, Mite faeces are a major source of house dust allergens. Nature, 1981. 289: 592-593.

Yoshiji H *et al.*, Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996, 56:2013-6

5 Zagury D *et al.*, Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3851-6

10 Zusman I, Sandler B, Gurevich P, Zusman R, Smirnoff P, Tendler Y, Bass D, Shani A, Idelevich E, Pfefferman R, Davidovich B, Huszar M, Glick J. Comparative study of the role of serum levels of p53 antigen and its tumor cell concentration in colon cancer detection. *Hum Antibodies Hybridomas*. (1996)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto inmunogénico estable para la inducción de anticuerpos contra una o varias proteínas antigénicas en un sujeto, caracterizado porque consiste en unos heterocomplejos inmunogénicos proteicos constituidos por asociaciones entre (i) unas moléculas de proteínas antigénicas y (ii) unas moléculas proteicas portadoras, porque por lo menos el 1 por ciento y porque menos del 40 por ciento de las proteínas antigénicas (i) están unidas con las moléculas proteicas portadoras (ii) por un enlace covalente, y porque la o las proteínas antigénicas (i) consisten en unas citoquinas producidas naturalmente por dicho sujeto.
- 10 2. Producto inmunogénico según la reivindicación 1, caracterizado porque cada heterocomplejo comprende (i) una pluralidad de proteínas antigénicas unidas a (ii) una molécula proteica portadora.
- 15 3. Producto inmunogénico según la reivindicación 2, caracterizado porque, para cada heterocomplejo inmunogénico, la pluralidad de proteínas antigénicas (i) está constituida por una pluralidad de ejemplares de una proteína antigénica única.
- 20 4. Producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 2 o 3, caracterizado porque, para cada heterocomplejo inmunogénico, las proteínas antigénicas (i) están constituidas por una pluralidad de ejemplares de una proteína normalmente reconocida como una proteína propia por las células del sistema inmunitario de dicho sujeto.
- 25 5. Producto según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende de 5 a 50 proteínas antigénicas (i) para una molécula proteica portadora (ii), preferentemente de 20 a 40 proteínas antigénicas (i) para una molécula proteica portadora (ii).
- 30 6. Producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque los enlaces covalentes entre una o varias de las proteínas antigénicas (i) y la molécula proteica portadora (ii) están realizados por medio de un agente químico de unión bifuncional.
- 35 7. Producto inmunogénico según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho agente químico de unión comprende por lo menos dos funciones aldehídos libres.
- 40 8. Producto inmunogénico según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho agente de unión es el glutaraldehído.
- 45 9. Producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la o las proteínas antigénicas (i) se seleccionan de entre la interleucina-4, el interferón alfa, el interferón gamma, el VEGF, la interleucina-10, el TNF alfa, el TGF beta, la interleucina-5 y la interleucina-6.
- 50 10. Producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se selecciona de entre los productos que comprenden los heterocomplejos siguientes, en los que las proteínas antigénicas (i), por un lado y la molécula portadora proteica (ii) por otro, son respectivamente:
 - a) (i) IL-4 y (ii) KLH;
 - b) (i) interferón alfa y (ii) KLH;
 - c) (i) VEGF y (ii) KLH;
 - d) (i) IL-10 y (ii)KLH;
 - e) (i) interferón alfa y (ii) gp160 de VIH1;
 - f) (i) IL-4 y (ii) el antígeno alérgeno Bet v 1; y
 - g) (i) el VEGF y (ii) la proteína E7 de un Papilomavirus; y
 - h) (i) el TNF α y (ii) KLH
- 55 11. Composición que comprende un producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 10.
- 60 12. Composición farmacéutica que comprende un producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 10, en asociación con uno o varios excipientes fisiológicamente compatibles.
- 65 13. Composición inmunogénica que comprende un producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 10, en asociación con uno o varios excipientes fisiológicamente compatibles.
14. Composición vacunal que comprende un producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 10, en asociación con uno o varios excipientes fisiológicamente compatibles.
15. Composición inmunogénica o composición vacunal según una de las reivindicaciones 13 o 14, caracterizada porque comprende el adyuvante de la inmunidad CpG.
16. Procedimiento de preparación de un producto inmunogénico según una de las reivindicaciones 1 a 9,

caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 5
- a) incubar las proteínas antigénicas (i), que consisten en unas citoquinas producidas naturalmente por un sujeto, y la molécula portadora (ii) en una relación molar (i):(ii) de 5:1 a 50:1, en presencia de un agente químico de unión;
 - b) estabilizar los heterocomplejos formados en la etapa a) mediante un tratamiento con el formaldehído; y
 - 10 c) recuperar el producto inmunogénico que comprende unos heterocomplejos inmunogénicos que se ha preparado en la etapa b).

17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque el agente químico de unión es el glutaraldehído.

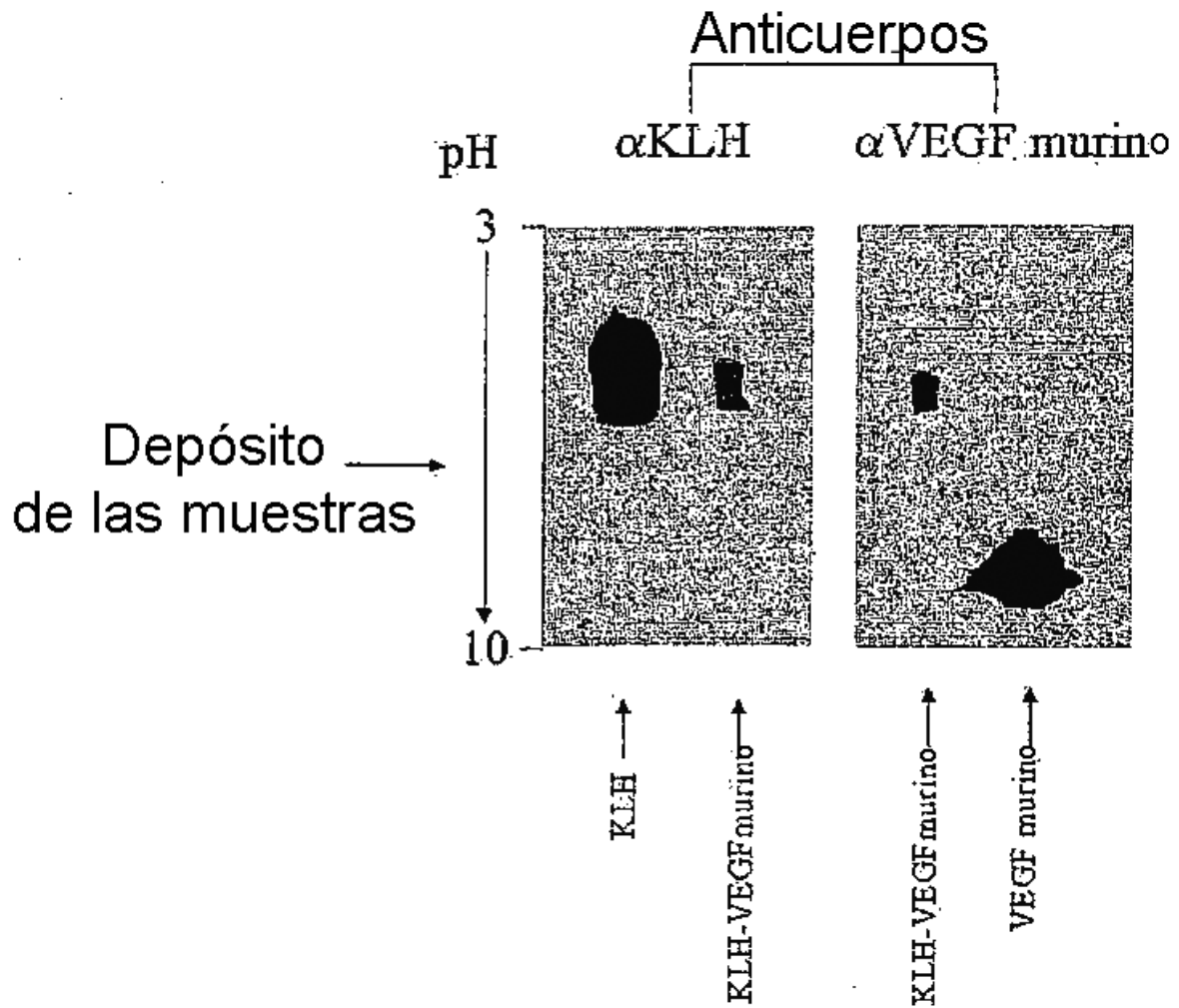


Figura 1

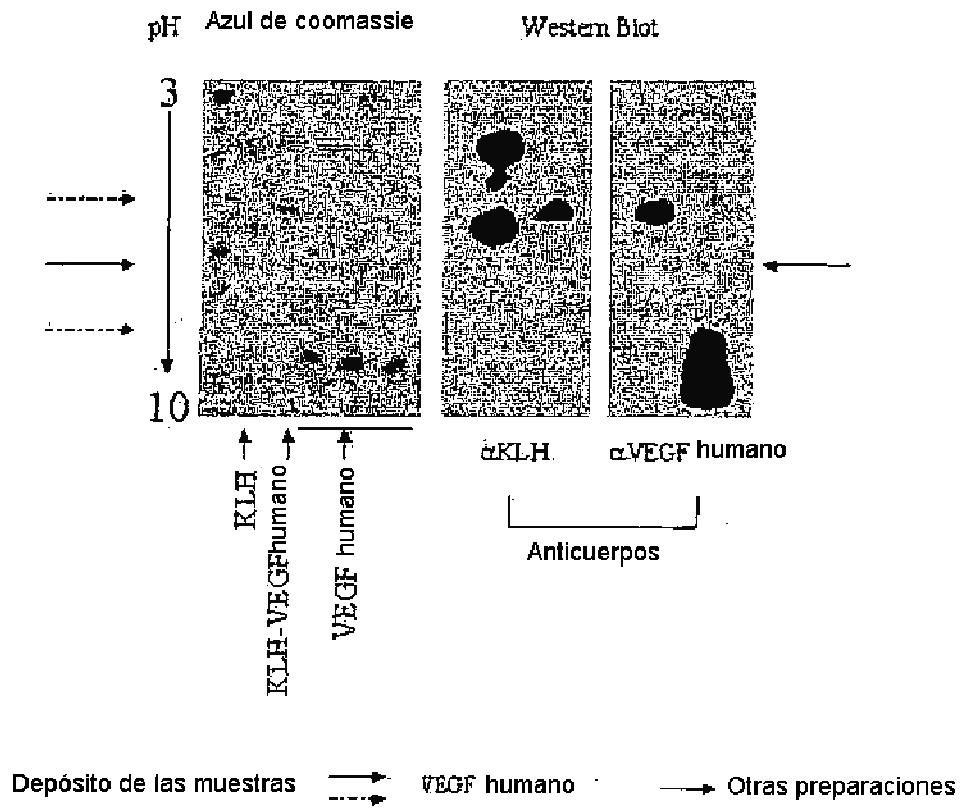


Figura 2

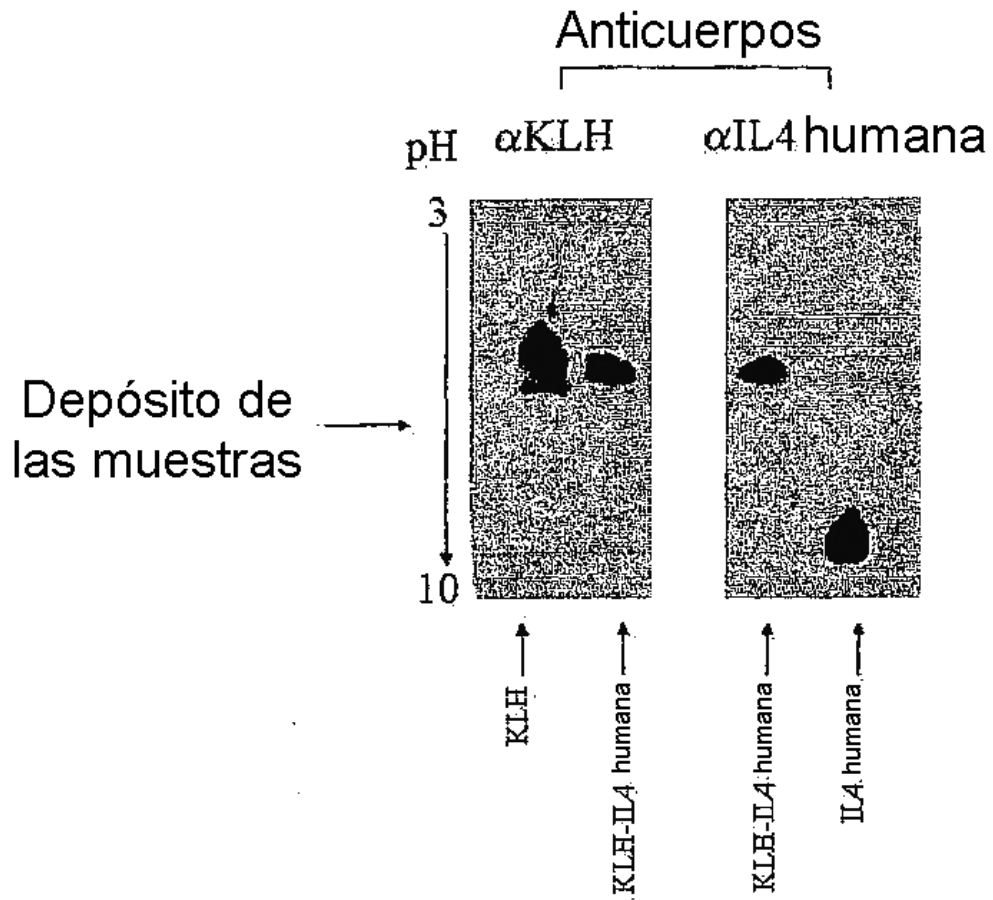


Figura 3

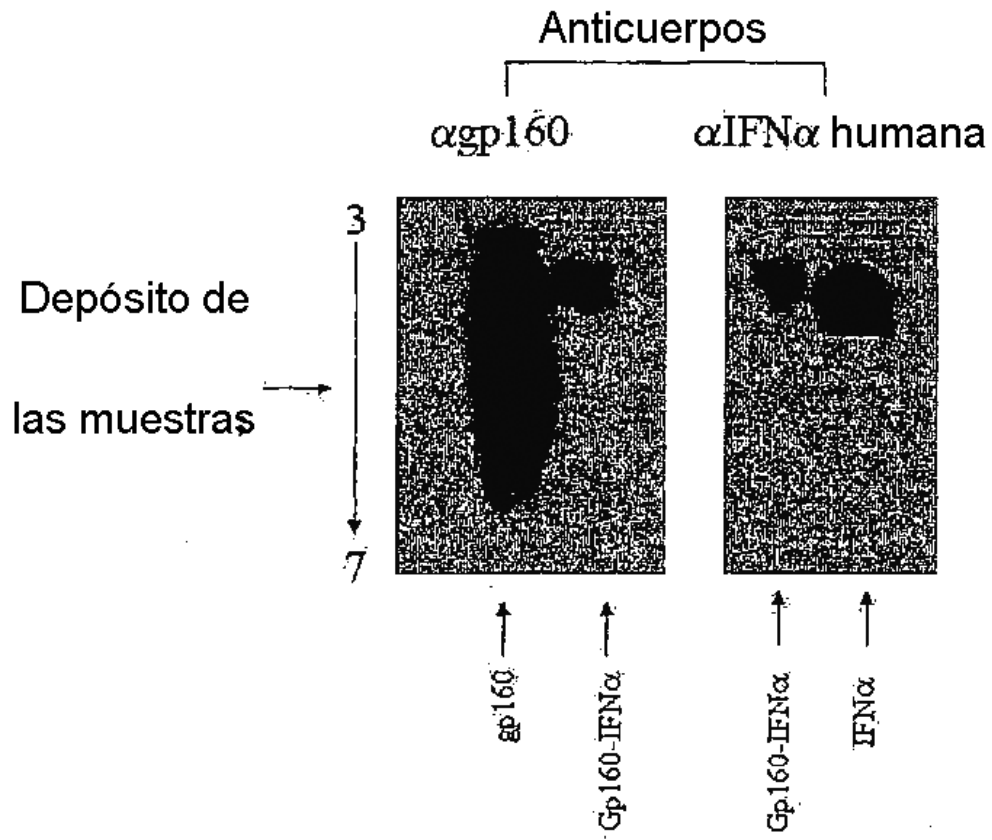


Figura 4

■ Suero después de la inmunización

□ Suero antes de la inmunización

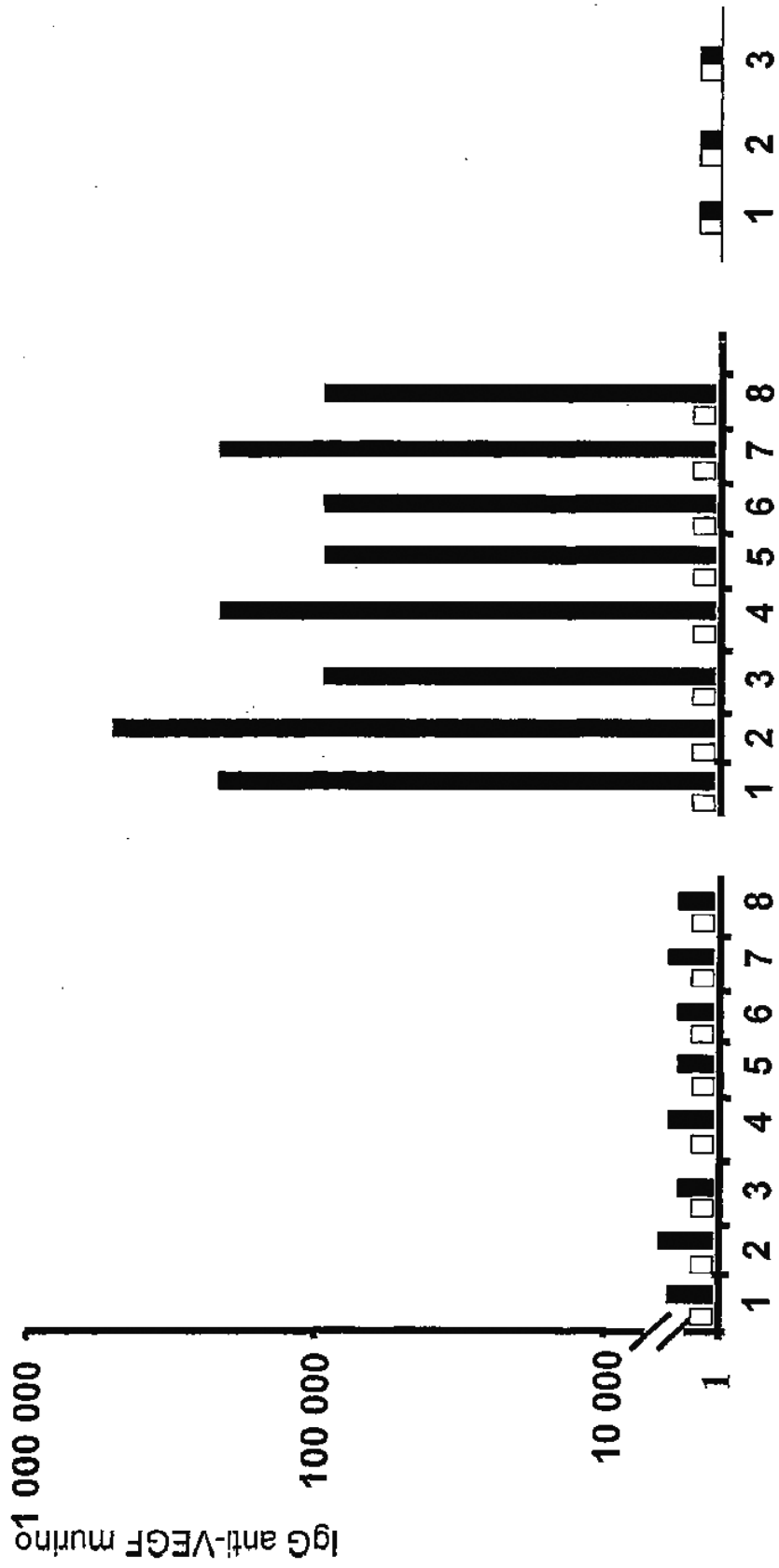


Fig. 5C

Fig. 5B

Fig. 5A

Figura 6

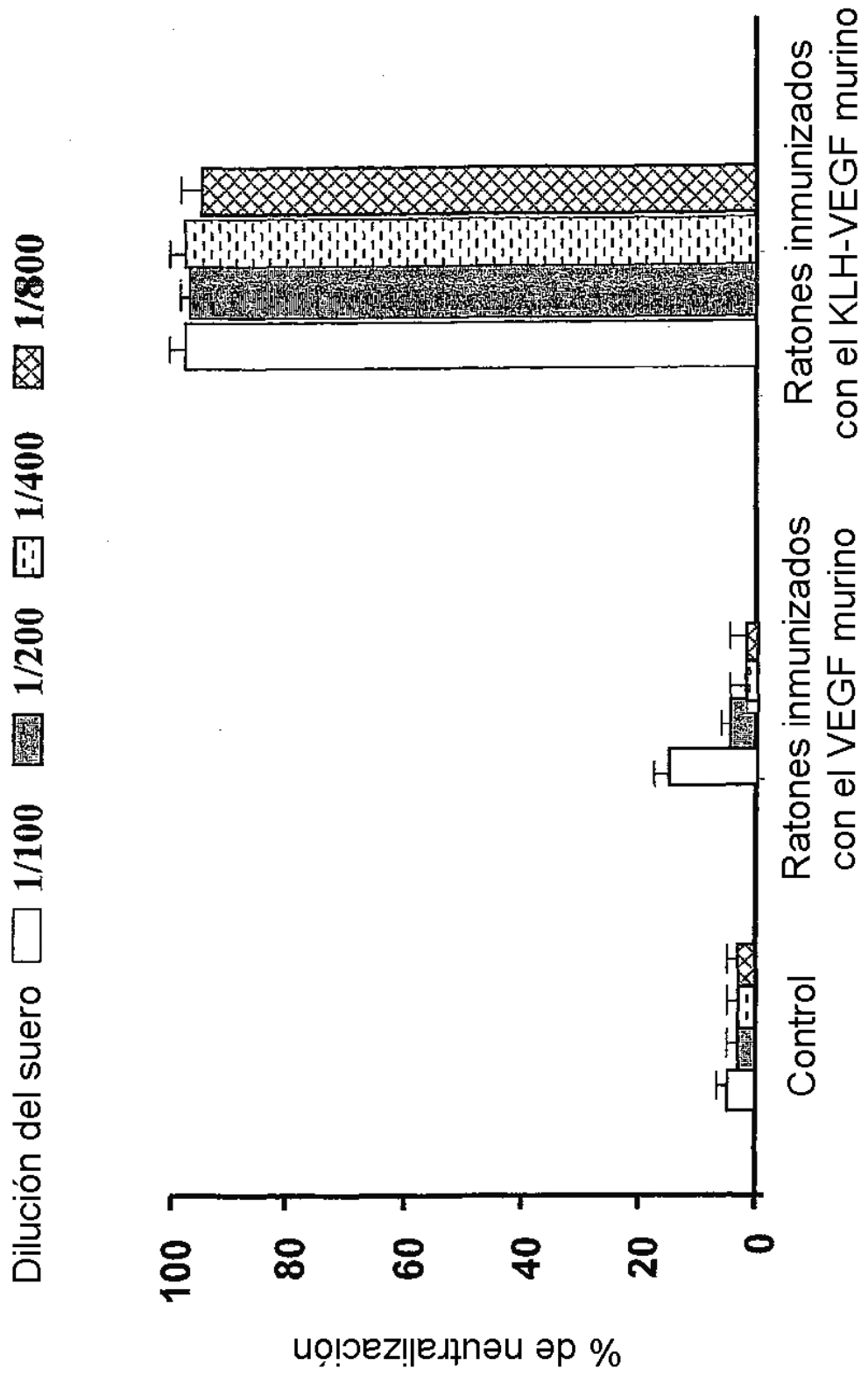


Figura 7

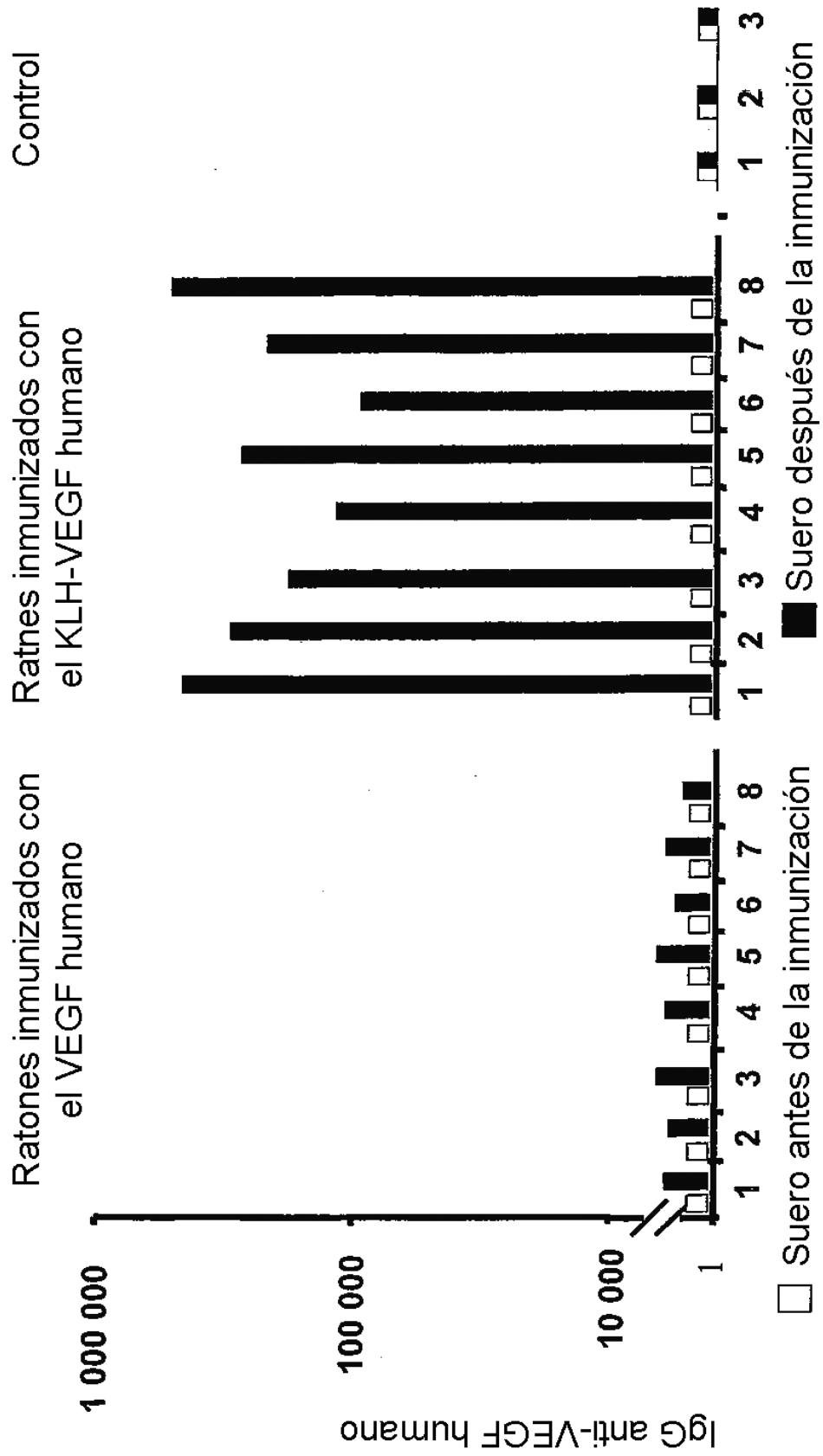


Figura 8

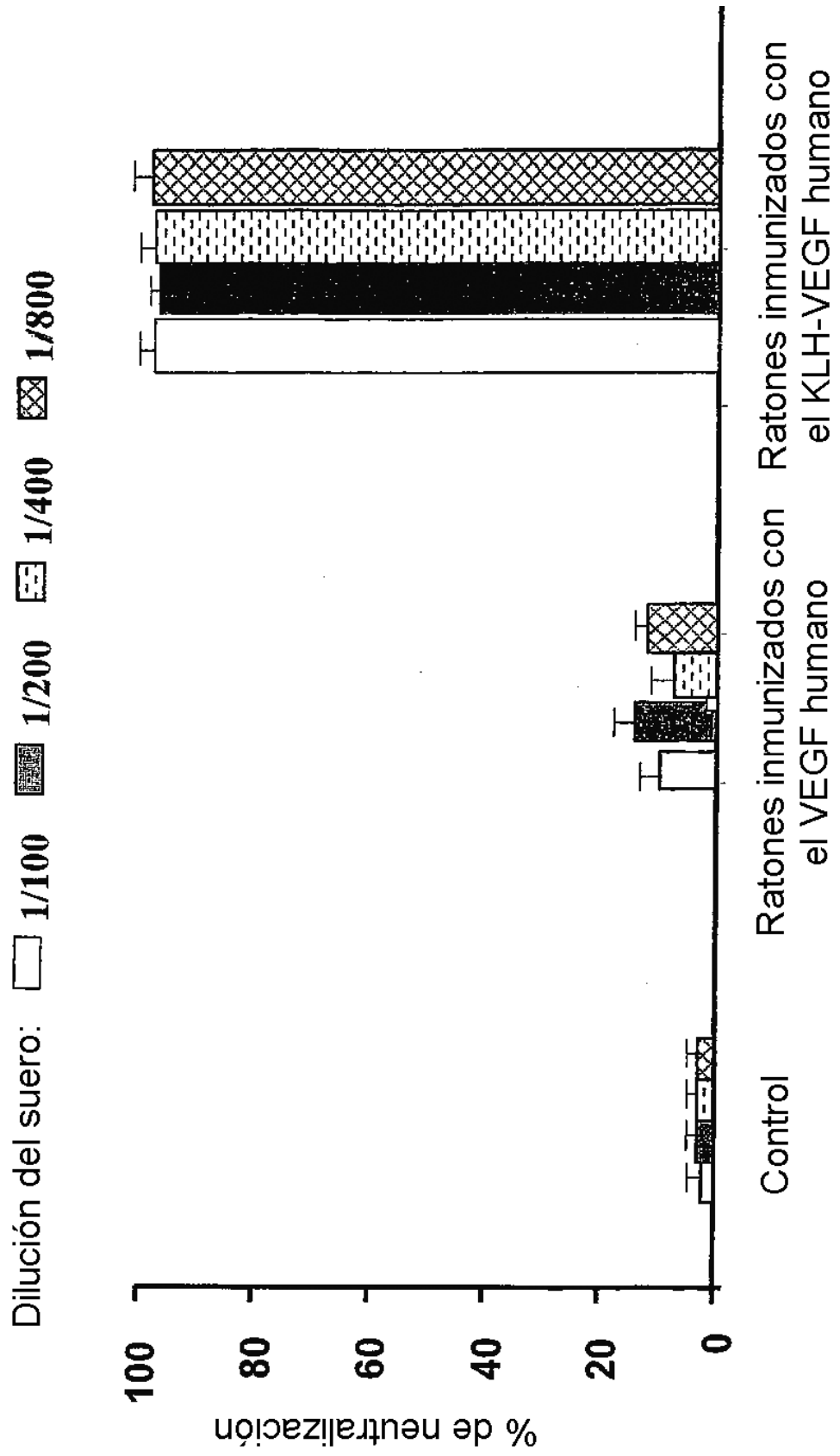


Figura 9

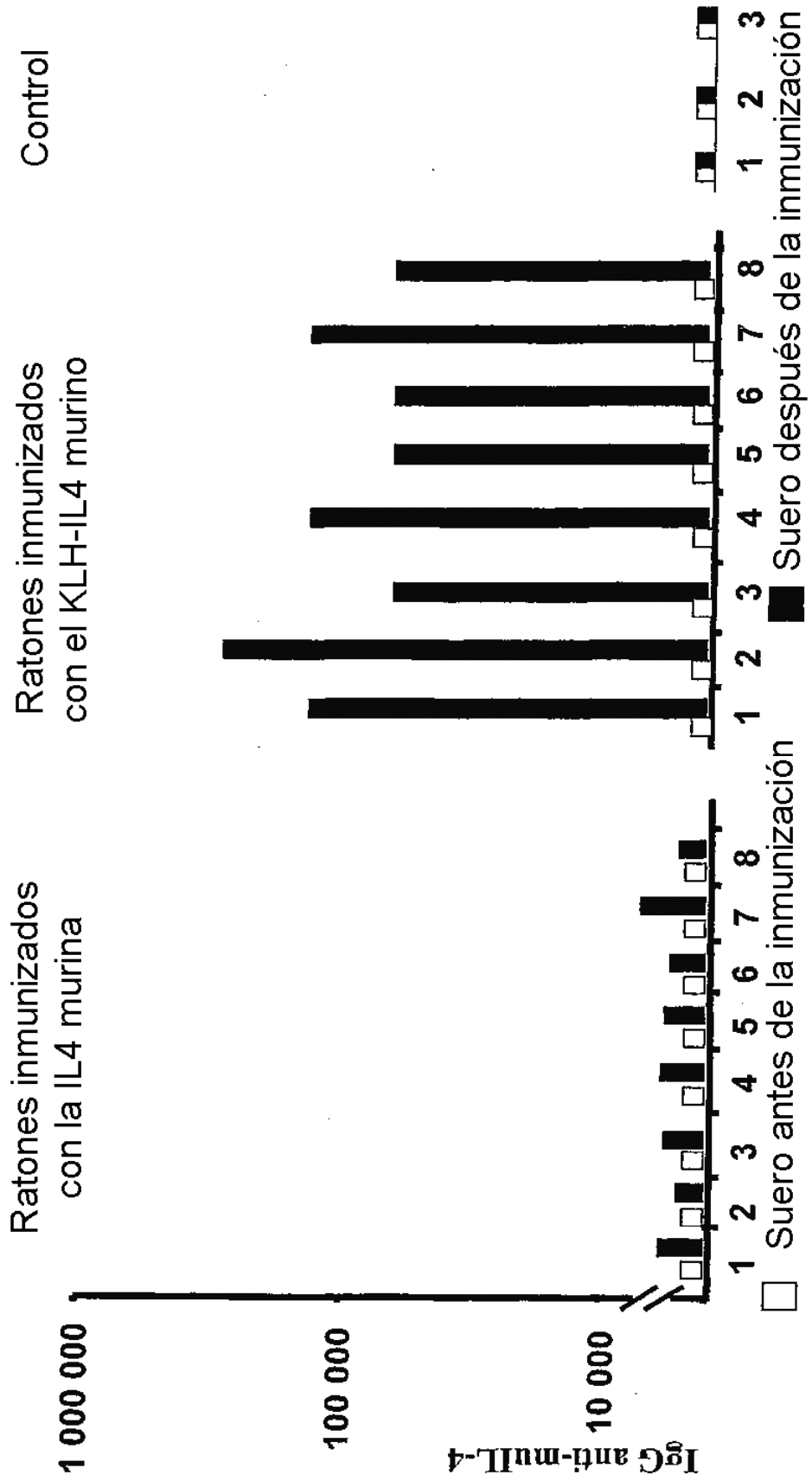


Figura 10

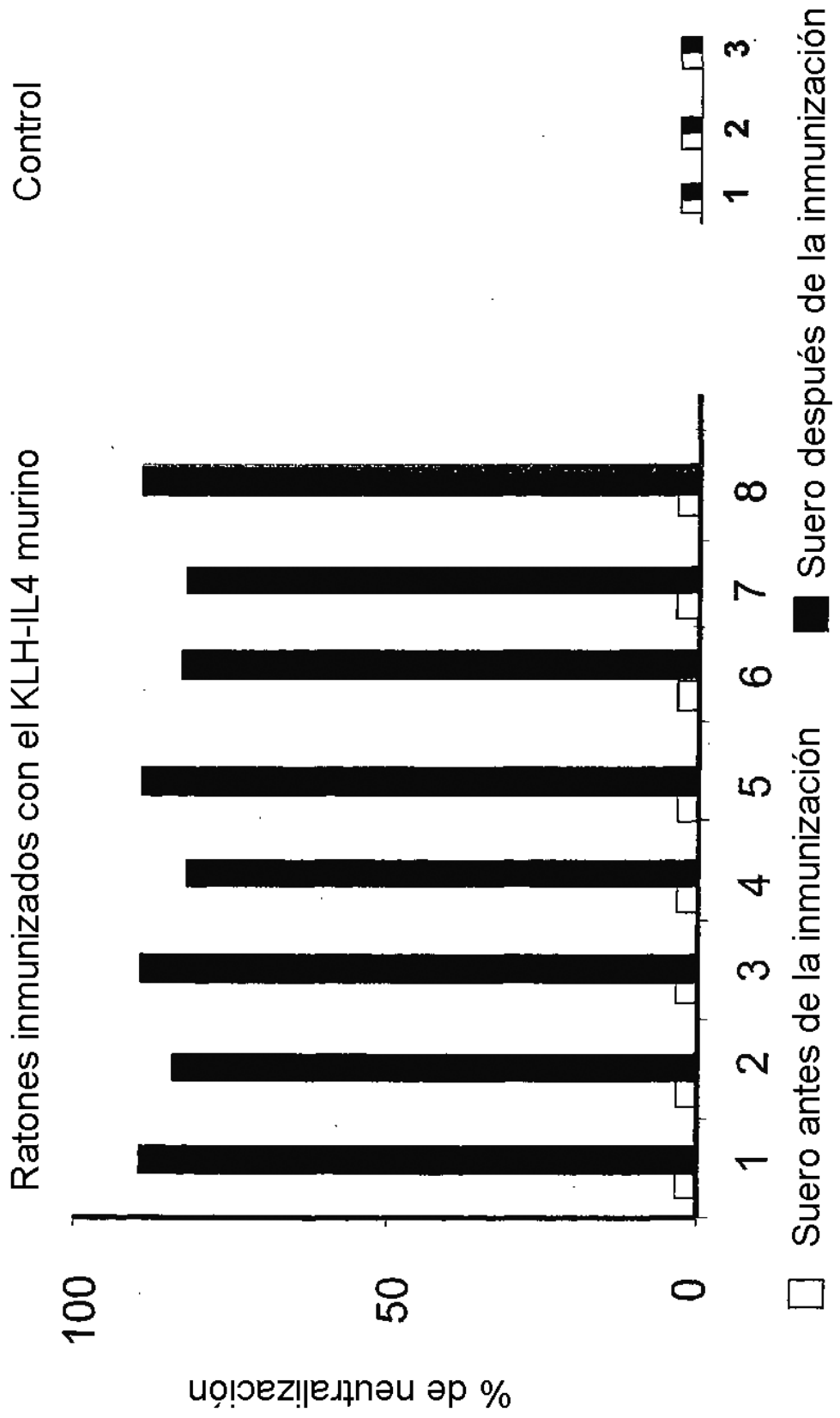


Figura 11

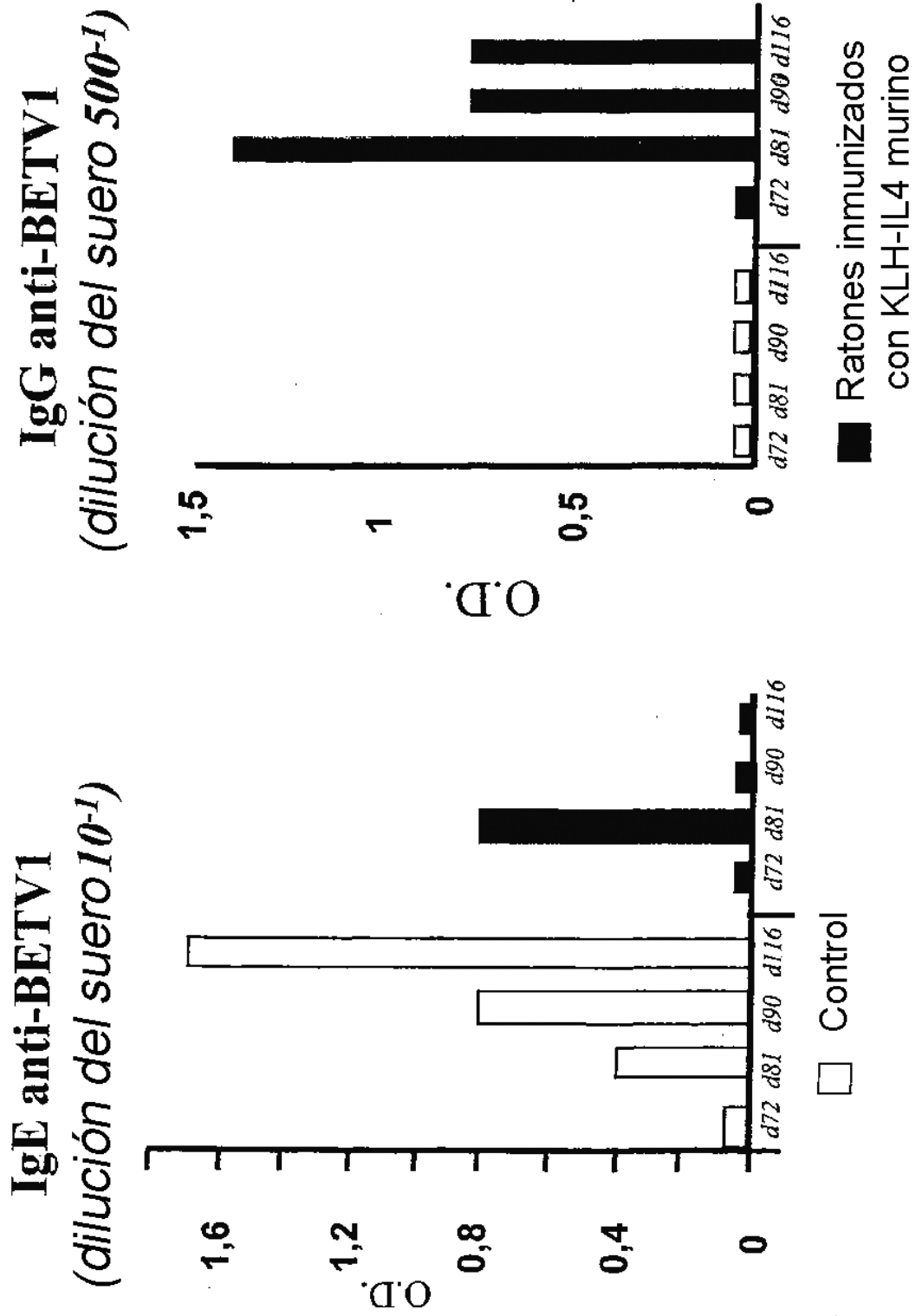


Figura 12

Ratones inmunizados con el KLH-IL4 humano Control

