

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 824**

51 Int. Cl.:

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2012 PCT/EP2012/056238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12136739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2012 E 12712661 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2694094**

54 Título: **Método para tratar afecciones relacionadas con IFNalfa**

30 Prioridad:

07.04.2011 EP 11305408
07.04.2011 US 201161472854 P
07.11.2011 EP 11188125

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2017

73 Titular/es:

NEOVACS (100.0%)
3-5 impasse Reille
75014 Paris, FR

72 Inventor/es:

GROUARD-VOGEL, GÉRALDINE;
DHELLIN, OLIVIER;
FANGET, BERNARD;
VANDEPAPELIÈRE, PIERRE y
ROUCAIROL, CAMILLE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 644 824 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

Método para tratar afecciones relacionadas con IFNalfa

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con una vacuna inmunogénica y su uso para tratar afecciones relacionadas con IFN α tales como lupus eritematoso sistémico.

10 Antecedentes de la invención

15 La familia IFN tipo 1 incluye IFN α , IFN β , IFN δ , IFN1, IFN κ , IFN τ , e IFN ω . Las formas más predominantes son IFN α , de la cual se describen 13 proteínas estrechamente relacionadas en humanos, y el único IFN β . A pesar del hecho de que diferentes formas de IFN tipo 1 pueden promover diferentes respuestas biológicas, todos los IFN tipo 1 se relacionan estructuralmente (sus genes carecen de intrones y se ubican en el brazo corto del cromosoma 9) y su señal es a través de las mismas subunidades receptoras (Van Boxel- Dezaire et al., *Immunity*, 2006; 25: 361-372).

20 El interés de la relación entre el IFN tipo 1 y los trastornos autoinmunitarios en la actualidad es cada vez mayor, debido a que los signos de su inducción, la llamada firma de interferón, se ha reportado recientemente en pacientes que sufren de diferentes enfermedades autoinmunitarias (Baccala et al., *Inmunol. Rev.* 2005; 204: 9-26). De hecho, debido a sus efectos inmunomoduladores, el IFN tipo 1 parece estar involucrado en diversas trayectorias patógenas de diversas afecciones autoinmunitarias.

25 El paradigma de la relevancia patogénica de IFN tipo 1 en la autoinmunidad es el lupus eritematoso sistémico (SLE). El SLE es una enfermedad crónica, caracterizada por una implicación de múltiples órganos, debido a un daño paradójico de los órganos, provocado por autoanticuerpos dirigidos a los autoantígenos. La etiología del SLE es compleja, que implica factores tanto genéticos como ambientales. Se ha mostrado que el nivel de IFN α en suero en el SLE, se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Dall'era et al., *Ann Rheum Dis*, 2005; 64: 1692-7).

30 El síndrome de Sjögren (SS), conocido también como síndrome sicca, es una afección autoinmunitaria sistémica, crónica, que afecta las glándulas exocrinas, en particular las glándulas salivales y lagrimales. También se ha observado actividad de IFN α elevada en el suero de pacientes que sufren de esta enfermedad. Finalmente, también se ha mostrado que otras afecciones, tales como la diabetes, artritis reumatoide, escleroderma, vasculitis y tiroiditis autoinmunitaria se asocian con altos niveles de IFN α .

35 Sedaghat et al. también sugirieron, recientemente, que el IFN tipo 1 puede cumplir una función en el agotamiento de células T de CD4⁺ en pacientes con VIH+, ya que muestran que el IFN tipo 1 afecta el estado estacionario de las dinámicas de las células T CD4⁺ normales, al desviar el equilibrio hacia los efectores Th1 que son células de vida corta, en lugar de las células T de memoria de vida larga (Sedaghat et al., *J. Virol.* 2008 82(4): 1870-1883). Esto se confirmó en Mandl et al., donde se sugiere disminuir la producción de IFN α mediante células dendríticas plasmacitoides, para mejorar la activación patológica inmunitaria (Mandl et al., *Nat. Med.* 2008).

40 Más aún, se ha reportado que la administración de IFN α exacerba la enfermedad subyacente en pacientes con psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria y esclerosis múltiple, e induce un síndrome similar a SLE en pacientes sin historia previa de enfermedad autoinmunitaria.

45 Por lo tanto, subsiste la necesidad de un agente que inhiba la actividad de IFN α .

50 La inmunización pasiva con anticuerpos neutralizadores monoclonales está siendo probada actualmente en ensayos clínicos con roalizumab y sifalimumab para el tratamiento de SLE. Sin embargo, dicha terapia presenta los inconvenientes de dirigirse únicamente a un subgrupo de los 13 para IFN α y el uso de anticuerpos monoclonales administrados pasivamente puede estar limitado por la inducción de anticuerpos antifármaco. Dichos anticuerpos antifármaco pueden neutralizar o de otra manera comprometer el efecto clínico de los fármacos y también se puede asociar con eventos adversos serios, relacionados con la reactividad cruzada con proteínas autólogas (De Groot et al., *Trends. Immunol*, 2007, 28 (11)).

55 Los experimentos preliminares que involucran la inyección de ratones con dosis de hasta 30 μ g de IFN α : KLH, resultaron en la generación de Abs que neutralizan IFN α . El IFN α 2b humano y el KLH se mezclaron en una relación molar de 20:1 (Mathian et al. 2011: *Annals of the Rheumatic Diseases* vol. 70, páginas 1138-1143).

60 De esta manera, la presente invención proporciona un método para inhibir la actividad de IFN α in vivo al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto inmunogénico que permite una inmunización activa que pueda romper la tolerancia de la célula B inmunológica y generar títulos elevados de anticuerpos neutralizadores policlonales contra IFN α y su uso para tratar afecciones relacionadas con IFN α .

65 Resumen

- Un objeto de la invención es un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora para uso en la prevención o tratamiento de una afección relacionada con IFN α en un sujeto en necesidad del mismo, en la que la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico que se va a administrar al sujeto es mayor de 30 mcg de producto inmunogénico por administración, preferiblemente por lo menos 60 mcg.
- 5 En una realización de la invención, la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico previene la ocurrencia de síntomas de una enfermedad unida a una sobreproducción de IFN α .
- 10 En otra realización de la invención, la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico previene el empeoramiento de una enfermedad vinculada a una sobreproducción de IFN α .
- 15 En otra realización de la invención, las afecciones relacionadas con IFN α comprenden lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, escleroderma, síndrome de Sjögren, vasculitis, VIH, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmunitaria y miositis.
- 20 En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico que se va a administrar al sujeto es desde 35 mcg hasta 1000 mcg de producto inmunogénico por administración, preferiblemente desde 60 mcg hasta 1000 mcg.
- En otra realización de la invención, el producto inmunogénico se administra al sujeto por lo menos dos veces en un mes.
- En otra realización de la invención, el producto inmunogénico se administra adicionalmente al sujeto por lo menos una vez cada tres meses.
- 25 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico se administra adicionalmente al sujeto cuando, en una muestra de suero obtenida del sujeto, la cantidad de anticuerpos anti- IFN α es indetectable.
- En otra realización de la invención, el producto inmunogénico se inactiva fuertemente, lo que significa que el producto muestra menos de 5% de actividad antivírica en las condiciones de PRUEBA B.
- 30 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico es capaz de neutralizar la actividad antivírica de IFN α en las condiciones de PRUEBA C.
- 35 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende por lo menos un subtipo de IFN α .
- En otra realización de la invención, el subtipo de IFN α es IFN α 2b y la molécula de proteína portadora es KLH.
- En otra realización de la invención, el producto inmunogénico es una vacuna, preferiblemente en la forma de una emulsión.
- 40 Otro objeto de la invención es una forma de dosificación unitaria que comprende más de 30 mcg de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora como se definió aquí anteriormente.
- 45 Otro objeto de la invención es un dispositivo médico que comprende más de 30 mcg de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora como se definió aquí anteriormente.
- Otro objeto de la invención es un kit que comprende por lo menos un frasco que contiene más de 30 mcg, preferiblemente por lo menos 60 mcg, de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora como se definió aquí anteriormente, por lo menos un frasco que contiene adyuvante, y medios para poner en contacto dicho producto inmunogénico con el adyuvante, y para emulsificar la mezcla de la solución acuosa con el adyuvante.
- 50 En una realización, el kit de la invención comprende
- 55 - por lo menos un frasco que contiene más de 30 mcg, preferiblemente por lo menos 60 mcg, de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora de acuerdo con la invención, y medios para solubilizar dicho producto inmunogénico, preferiblemente en una solución acuosa, o
- 60 - por lo menos un frasco que contiene una solución preferiblemente una solución acuosa, que comprende más de 30 mcg, preferiblemente por lo menos 60 mcg, de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora de acuerdo con la invención, y
- por lo menos un frasco que contiene adyuvante, y medios para poner en contacto dicha solución con el adyuvante, y para emulsificar la mezcla de la solución con el adyuvante.
- 65 Definiciones

5 Como se utiliza aquí, el término “interferón α ” o “IFN α ” se refiere a proteínas IFN alfa codificadas por un gen funcional del sitio del gen interferón alfa con 75% o más de identidad de secuencia con IFN alfa 1 (número Genbank NP_076918 o proteína codificada por número Genbank NM_024013). Ejemplos de subtipos IFN alfa humanos incluyen IFN alfa 1 (número Genbank NP_076918), alfa 2a (número Genbank ITF_A), alfa 2b (número Genbank AAP20099), alfa 4 (número Genbank NP_066546), alfa 5 (número Genbank P01569), alfa 6 (P05013), alfa 7 (número Genbank P01567), alfa 8 (número Genbank P32881), alfa 10 (número Genbank P01566), alfa 14 (número Genbank P01570), alfa 16 (número Genbank NP_002164), alfa 17 (número Genbank P01571) y alfa 21 (número Genbank NP_002166). Ejemplos de subtipo IFN α de mamífero no humano se pueden encontrar en Genbank tan bien conocidos por el experto en la técnica (para una revisión véase Pestka et al Immunological reviews 2004, 202:8-32).

15 Como se utiliza aquí, el término “respuesta inmunitaria” se refiere a la acción, por ejemplo, de linfocitos, células que presentan antígenos, células fagocíticas y macromoléculas producidas por las células anteriores o el hígado (que incluyen anticuerpos, citoquinas y complementos).

20 Como se utiliza aquí, un anticuerpo que “inhibe la actividad biológica” o “neutraliza la actividad biológica” de IFN α está destinado a hacer referencia a un anticuerpo que inhibe la actividad de esa citoquina por lo menos en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% o más, en comparación con el nivel de actividad de la citoquina en ausencia del anticuerpo, por ejemplo, utilizando un análisis funcional, tal como los descritos en los Ejemplos.

25 Como se utiliza aquí, el término “molécula de proteína portadora” se refiere a una proteína o un péptido de por lo menos 15 aminoácidos de largo que, cuando se está asociando parcialmente de manera covalente con la molécula de IFN α para formar heterocomplejos, permite que se presente un número grande de antígenos de IFN α a los linfocitos B.

30 Como se utiliza aquí, el término “sujeto” incluye cualquier humano o mamífero no humano, tal como primates, perros, gatos, caballos, ovejas...

35 Como se utiliza aquí, el término “paciente” se refiere a un sujeto que está afectado por una afección relacionada con IFN α .

40 Como se utiliza aquí, el término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad suficiente para provocar un resultado clínico benéfico o deseado (por ejemplo, mejora en la afección clínica).

45 Como se utiliza aquí, el término “tratamiento” o “tratar” se refiere a una intervención clínica en un intento por alterar el curso natural de una enfermedad del sujeto o paciente que se está tratando, y se puede efectuar ya sea para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables incluyen, pero no se restringen a ellos: prevenir la ocurrencia o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, suprimir, disminuir o inhibir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad; ralentizar la velocidad del progreso de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad y provocar la remisión, mantener el estado de remisión o el pronóstico mejorado.

50 Descripción detallada

55 Aunque los reguladores de IFN α son de origen natural en el cuerpo, su capacidad para regular los niveles de citoquina en enfermedades tales como SLE y SS parece ser insuficiente. La meta de la inmunización terapéutica anti-IFN α de la invención es elevar los niveles de anticuerpos contra la citoquina, al mismo tiempo incrementar su afinidad y neutralizar la actividad, lo que resulta en la reducción del exceso de citoquinas e inhibir sus efectos patógenos, sin interferir con otros procesos metabólicos y fisiológicos.

60 Un objeto de la presente invención es un método para tratar una afección relacionada con IFN α en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora, en la que dicha cantidad terapéuticamente efectiva es mayor de 30 mcg (μ g) de producto inmunogénico por administración.

65 En una realización de la invención, dicha cantidad terapéuticamente efectiva es de por lo menos 60 mcg (μ g) de producto inmunogénico por administración.

En una realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 1000 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 750 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 500 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 450 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 400 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 350 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad

- terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 300 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 250 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 200 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 150 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es de más de 30 mcg, preferiblemente más de 60 mcg a 100 mcg.
- 5
- 10 En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 1000 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 750 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 500 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 450 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 400 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 350 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 300 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 250 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 200 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 150 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 35 mcg hasta 100 mcg.
- 15
- 20
- 25 En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 1000 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 750 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 500 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 450 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 400 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 350 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 300 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 250 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 240 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 200 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 150 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 120 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 100 mcg.
- 30
- 35
- 40
- 45 En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 mcg hasta 400 mcg.
- 50 En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 240 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es 60 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es 120 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es 240 mcg.
- 55 En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva corresponde a una cantidad de proteínas totales determinadas utilizando un ensayo de proteínas Bradford como se conoce bien en la técnica.
- 60 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra por lo menos dos veces en un mes la cantidad terapéuticamente efectiva de producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 65 En otra realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra dos veces en 1 mes la cantidad terapéuticamente efectiva de producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente. En esta realización, el sujeto se puede administrar una vez en el día 0 y la segunda vez entre el día 7 y día 28. En otra realización, el sujeto se puede administrar una vez en el día 0 y la segunda vez entre el día 7 y día 21. En una realización, el sujeto se administra una vez en el día 0 y la segunda vez en el día 28.

- 5 En otra realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en 1 mes la cantidad terapéuticamente efectiva de producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente. En esta realización, el sujeto que se va a tratar se puede administrar una vez en el día 0, la segunda vez entre el día 7 y día 14 y la tercera vez entre el día 21 y día 28. En una realización, el sujeto se administra una vez en el día 0, la segunda vez en el día 7 y la tercera vez en el día 28.
- 10 En otra realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra cuatro veces en 3 meses con la cantidad terapéuticamente efectiva de producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente. En esta realización, el sujeto que se va a tratar se puede administrar una vez en el día 0, la segunda vez entre el día 7 y día 14, la tercera vez entre el día 21 y día 28 y la cuarta vez entre el día 77 y día 84. En una realización, el sujeto se administra una vez en el día 0, la segunda vez en el día 7, la tercera vez en el día 28 y la cuarta vez en el día 84.
- 15 En otra realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le puede administrar adicionalmente una vez cada tres meses la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 20 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en un mes como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente una vez cada tres meses con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 25 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra cuatro veces en tres meses como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente una vez cada tres meses con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 30 En otra realización de la invención, el sujeto que se va a tratar se puede administrar adicionalmente una vez cada seis meses con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 35 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en un mes o cuatro veces en tres meses como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente una vez cada seis meses con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 40 En otra realización de la invención, el sujeto que se va a tratar se puede administrar adicionalmente una vez al año con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 45 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en un mes o cuatro veces en tres meses como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente una vez cada seis meses con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 50 En otra realización de la invención, el sujeto que se va a tratar se puede administrar adicionalmente una vez cada 5 años la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 55 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en un mes o cuatro veces en tres meses como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente una vez cada 5 años la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 60 En otra realización de la invención, el sujeto que se va a tratar se puede administrar adicionalmente una vez cada 10 años la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- 65 En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en un mes o cuatro veces en tres meses como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente una vez cada 10 años la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente.
- En otra realización de la invención, el sujeto que se va a tratar se puede administrar adicionalmente con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente cuando la cantidad de anticuerpos contra IFN α es indetectable en una muestra de suero obtenida del sujeto.
- En una realización de la invención, al sujeto que se va a tratar se le administra tres veces en un mes o cuatro veces en tres meses como se describió aquí anteriormente, y luego se administra adicionalmente con la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente cuando la cantidad de anticuerpos contra IFN α es indetectable en una muestra de suero obtenida del sujeto.
- Se puede llevar a cabo cuantificación de la cantidad de anticuerpos contra IFN α en una muestra de suero mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, tal como un anti-IFN ELISA.
- Un ejemplo de llevar a cabo dicho método es el siguiente:

- recubrir una placa de 96 pozos con 100 ng del subtipo de IFN α utilizado para preparar el producto inmunogénico tal como IFN α -2b e incubar la placa durante la noche a 2°C-8°C,

- bloquear la placa con un regulador de bloqueo durante 90 min a 37°C,

- incubar la placa con la muestra de suero y agrupamiento de muestra intacta durante 90 min a 37°C: la muestra de suero se diluye normalmente en una serie de dilución de dos veces partiendo desde la dilución 200x hasta por lo menos 8 diluciones,

- incubar la placa con el segundo anticuerpo marcado tal como una inmunoglobulina antihumana de cabra conjugada a HRP,

- desarrollar el complejo con una solución de sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD). Después de detener la reacción enzimática, se determina la intensidad del color resultante mediante métodos espectrofotométricos a 492 nm.

Se expresa el título anti-IFN para cada muestra como la dilución mínima para la cual el valor OD medio es mayor que el valor de corte:

$$\text{Valor de corte} = \text{OD medio del agrupamiento de suero intacto} \times 2.08$$

en el que el valor de corte N es igual a 2.08.

Después se expresará el título anti-IFN para cada muestra como la dilución mínima para la cual el valor OD medio es mayor que el valor de corte. La primera dilución que es 200, se consideran negativos los pacientes si su OD a 1/200 es inferior al valor de corte (Mire-Sluis et al., 2004, J. Immunol. Meth. 289: 1-16).

En una realización de la invención, el sujeto que se va a tratar está sufriendo de una afección relacionada con IFN α .

En otra realización de la invención, el sujeto que se va a tratar presenta cantidad indetectable de anticuerpos anti- IFN α en el suero.

[Mecanismo de acción]

La presente invención también se relaciona con un producto inmunogénico que es útil para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero al que se administra dicho producto inmunogénico, que incluye una respuesta inmunitaria humoral en la que los anticuerpos neutralizan las propiedades inmunosupresoras, apoptóticas o angiogénicas de la citoquina endógena IFN α .

La presente invención también se relaciona con un método para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero en necesidad del mismo, dicho método comprende la administración de un producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente a dicho mamífero. En una realización, dicha respuesta inmunitaria incluye una respuesta inmunitaria humoral en la que se inducen los anticuerpos que neutralizan las propiedades inmunosupresoras, apoptóticas o angiogénicas de la citoquina endógena.

En una realización de la invención, el producto inmunogénico es un derivado de citoquina inactivada pero inmunogénica derivada de IFN α , acoplada químicamente a una proteína portadora extraña, que estimula el auxiliar T, tal como, por ejemplo, KLH. Dicho producto inmunogénico tiene la capacidad de interrumpir en la tolerancia de célula B pero no de la célula T a IFN α . La tolerancia de la célula T auxiliar contra sí misma es esquivada al unir IFN α con la proteína portadora extraña.

Se activan células B específicas para IFN α después que se presenta la unión del antígeno y la endocitosis del producto inmunogénico y los péptidos específicos portadores, por medio de las moléculas del Complejo clase II de Histocompatibilidad Mayor (MHC). Esta señal de activación no es suficiente para inducir la diferenciación de células B, en el caso de un antígeno dependiente de T, pero debido a que las células B procesan los antígenos propios y portadores, la ayuda de la célula T se puede dar por las células T específicas a la proteína propia o portadora. Debido a que la selección de células T es muy estricta, no hay activación de células T específicas al antígeno propio.

Las células dendríticas (DC) también pueden absorber el antígeno propio y la molécula portadora y los péptidos de portador específicos presentes a través de sus moléculas MHC de clase II. Por lo tanto, las DC son capaces de activar las células auxiliares T intactas, específicas al portador. Las células auxiliares T en cambio son capaces de proporcionar células auxiliares T específicas de portador a células B específicas para el antígeno propio y presentar péptidos portadores en sus moléculas MHC de clase II.

Las células auxiliares T específicas para el portador interactúan con células B específicas para el antígeno propio, generando una respuesta de anticuerpo normal contra el antígeno propio.

Se utiliza principalmente el producto inmunogénico en composiciones de vacuna para tratar una enfermedad ligada con la sobreproducción de IFN α .

5 Más específicamente, esta invención se relaciona con un método para tratar una enfermedad vinculada a una sobreproducción de IFN α que comprende una etapa para administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico de la invención.

10 Esta invención también se relaciona con un método para tratar una enfermedad vinculada a una sobreproducción de IFN α que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico, en la que la administración del producto inmunogénico previene la ocurrencia de síntomas de la enfermedad.

15 La invención también se relaciona con un método para tratar una enfermedad vinculada a una sobreproducción de IFN α que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico, en la que la administración del producto inmunogénico previene el empeoramiento de la enfermedad.

20 La invención también se relaciona con un método para tratar una enfermedad vinculada a una sobreproducción de IFN α que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico, en la que la administración del producto inmunogénico induce la producción de anticuerpos que neutralizan la actividad de IFN α endógeno.

La invención también se relaciona con un método para tratar una enfermedad vinculada a una sobreproducción de IFN α que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico, en la que la administración del producto inmunogénico induce la neutralización de la actividad de IFN α endógeno.

25 Ejemplos de enfermedades ligadas a una sobreproducción de IFN α incluyen, pero no se limitan a lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, escleroderma, síndrome de Sjögren, vasculitis, VIH, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmunitaria y miositis.

30 Un objeto adicional de la invención consiste de un método para inducir la producción de anticuerpos que neutralizan la actividad de IFN α endógeno en un sujeto, que comprende una etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico.

[El producto inmunogénico]

35 El producto inmunogénico como se utiliza en la invención comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora tal como KLH, en la que se inactiva el producto inmunogénico.

40 El producto inmunogénico como se utiliza en la invención es un complejo entre por lo menos un subtipo IFN α recombinante y por lo menos una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH obtenido por conjugación con glutaraldehído y posterior inactivación con formaldehído.

45 En una realización de la invención, la molécula de proteína portadora puede ser cualquier molécula portadora utilizada convencionalmente en inmunología, tal como KLH (hemocianina de lapa californiana), ovoalbúmina, albúmina de suero de bovino (BSA), toxoide de tétanos, toxoide de toxina de cólera diftérica B, toxina de difteria mutante no tóxica (CRM197), proteína de membrana exterior de meningitis de neiseria en vesículas de membrana externa, proteína de membrana externa de Haemophilus influenzae no tipeable, toxina A de Pseudomonas aeruginosa, partícula similar a virus (VLP)... En una realización, dicho portador es KLH. Preferiblemente el producto de partida de KLH consiste de una KLH altamente purificada, extraída de la linfa del molusco gasterópodo marino Megathura cremulata. La KLH producida naturalmente consiste en general de una estructura didecámara que es un ensamble tubular no covalente de 20 subunidades.

50 En otra realización de la invención, el subtipo IFN α recombinante puede ser cualquier subtipo entre IFN alfa 1, alfa 2a, alfa 2b, alfa 4, alfa 5, alfa 6, alfa 7, alfa 8, alfa 10, alfa 14, alfa 16, alfa 17 y alfa 21.

55 Se pueden obtener los subtipos de IFN α recombinante mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, utilizando las secuencias de Genbank que se describieron aquí anteriormente. Por ejemplo, la producción del subtipo de IFN α recombinante se puede llevar a cabo al cultivar células que contienen un vector de expresión que comprende el gen del subtipo de IFN α y luego cosechar los cuerpos de inclusión y, finalmente, purificar el subtipo de IFN α .

60 En una realización de la invención, el subtipo IFN α recombinante es el subtipo de IFN α 2.

En una realización de la invención, el producto inmunogénico comprende por lo menos el subtipo de IFN α 2.

65 En una realización de la invención, el subtipo IFN α recombinante es una solución líquida, preferiblemente una solución reguladora que tiene un pH que varía desde 3.5, preferiblemente desde 6 hasta 7.8.

En una realización, cuando el sujeto que se va a tratar es un humano, el IFN α recombinante utilizado es humano.

En una realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que dicho producto inmunogénico se reconoce por un anticuerpo anti-IFN α .

5 El reconocimiento del producto inmunogénico mediante un anticuerpo anti-IFN α se puede llevar a cabo por medio de métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como un ELISA intercalado anti-IFN α /proteína portadora. Se desarrolla el ELISA (PRUEBA D) mediante cualquier medio colorimétrico conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, utilizando un anticuerpo de detección marcado con biotina, un sistema de amplificación HRP de poli-estreptavidina y una solución de sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina.

Un ejemplo de dicho método es el siguiente:

- 15 - recubrir una placa con el anticuerpo de captura, tal como por ejemplo un anticuerpo anti-KLH policlonal de conejo,
- bloquear la placa con un regulador de bloqueo (tal como caseína al 2% en PBS por ejemplo) durante 90 min a 37°C,
- incubar durante 90 min a 37°C la placa con una serie de dilución del producto inmunogénico desde 250 ng/ml hasta 8 diluciones dobles o con controles negativos tales como KLH y IFN α ,
- 20 - incubar 90 min a 37°C la placa con el anticuerpo de detección tal como por ejemplo un anticuerpo anti-IFN α biotinilado,
- incubar la placa con estreptavidina-HRP durante 30 min a 37°C y desarrollar el complejo con una solución de sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) durante 30 min. Después de detener la reacción enzimática, se determina la intensidad del color resultante mediante métodos espectrofotométricos a 490 nm.

30 Cuando la densidad óptica de los pozos que contienen el producto inmunogénico es por lo menos 10 veces superior a la densidad óptica de los pozos que contienen el control negativo, el experto en la técnica considera que el producto inmunogénico se reconoce por un anticuerpo anti-IFN α y que el IFN α en el producto inmunogénico se acopla a la KLH.

En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que dicho producto inmunogénico es altamente inmunogénico, lo que significa que el producto es capaz de inducir anticuerpos anti-IFN α in vivo en las condiciones de la PRUEBA A probada a continuación.

35 La prueba A se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente método:

0.3 a 10 μ g de proteínas totales (según se determina por un ensayo de proteínas Bradford) del producto inmunogénico se inyecta en ratones Balb/c de 6-8 semanas dos veces en 30 días, preferiblemente en el día 0 y día 21. Una muestra de suero se obtiene antes de inmunización (muestra de suero pre-inmunitaria) y entre el día 30 y día 40 (muestra de suero de prueba), preferiblemente en el día 31. Un anti-IFN ELISA α se lleva a cabo como se explicó aquí anteriormente.

45 En resumen, una placa de 96 pozos se recubre con 100 ng del subtipo de IFN α utilizado para preparar el producto inmunogénico tal como IFN α -2b y se incuba durante la noche a 2°C-8°C. La placa luego se bloquea con un regulador de bloqueo durante 90 min a 37°C. Se agregan 100 μ l de muestra pre-inmunitaria en dilución 1/2500 y una serie de dilución desde 1/2500 hasta 8 diluciones dobles de las muestras de suero (pre-inmunitaria y prueba) a los pozos. Un anticuerpo secundario marcado con inmunoglobulinas de anti-ratón tal como un anticuerpo conjugado con HRP se agrega finalmente a los pozos y el ELISA se desarrolla utilizando cualesquier medios colorimétricos conocidos en la técnica tales como por ejemplo una solución de sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina.

50 Cuando la densidad óptica de los pozos que contienen la muestra de suero de prueba es por lo menos 2 veces superior a la densidad óptica de los pozos que contienen la muestra de suero pre-inmunitaria, el experto en la técnica considera que el producto inmunogénico es inmunogénico, lo que significa que ha inducido los anticuerpos anti-IFN α in vivo.

55 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que el IFN α se inactiva fuertemente, lo que significa que el producto muestra menos de 5%, preferiblemente menos de 1% de actividad antivírica de IFN α en las condiciones de la PRUEBA B citada a continuación. En una realización, el producto inmunogénico de la invención a una concentración de 500 ng/mL o más muestra menos de 5%, preferiblemente menos de 1% de actividad antivírica de IFN α a una concentración de 500 ng/mL o más en las condiciones de la PRUEBA B.

60 Este análisis se basa en el efecto protector de IFN α sobre el efecto citopático (CPE) del virus de estomatitis vesicular (VSV) en células de riñón de bovino de Madin-Darby (MDBK). Este ensayo también se puede llevar a cabo utilizando células humanas Hep-2C o A549 y el virus EMCV. La prueba B se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente método:

65

5 El producto inmunogénico y el subtipo IFN α recombinante utilizado para preparar el producto inmunogénico (control positivo) se diluyen a por lo menos 500 ng/ml y por lo menos 1000 U/ml respectivamente en medio Basal (RPMI complementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, Hepes 1 mM). 50 μ l del producto inmunogénico y el control positivo se colocan en placa en una placa de 96 pozos y se diluyen en una serie de diluciones dobles en el medio Basal. Se agregan 2 10^4 células MDBK en cada pozo en 50 μ l de medio Celular (RPMI complementado con 4% de FBS, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y Hepes 1 mM) y la placa se incuba durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. El virus luego se diluye en medio Basal a por lo menos 10 TCID₅₀ (Dosis para Infección de Cultivo de Tejido 50:10 veces la dilución para matar 50% de células infectadas). La placa se vacía y se agrega 100 μ l del virus diluido. La placa luego se incuba durante la noche a 37°C, 5% de CO₂.

10 Al final del cultivo, se evalúa la viabilidad de las células MDBK utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de dichos métodos es el siguiente: se agregan 20 μ l/pozo de una solución de MTS/PMS (100 μ l de MTS/5 ml de PMS; Promega G5430) a los pozos y la placa se incuba durante otras 4h a 37°C 5% de CO₂. La placa luego se lee a 490 nm sobre un espectrofotómetro.

15 El porcentaje de actividad antivírica se calcula según lo siguiente:

$$\% \text{ de actividad antiviral} = [\text{OD}_{\text{producto}} - \text{OD}_{\text{virus}}] / [\text{media OD}_{\text{células}} - \text{OD}_{\text{virus media}}] * 100$$

20 OD_{producto} significa la densidad óptica de pozo con el producto inmunogénico o con el control positivo (subtipo IFN α).

OD_{virus} significa la densidad óptica del pozo de control con solo el virus.

25 OD_{células} significa la densidad óptica del pozo de control con IFN α y virus.

El valor EC₅₀, que corresponde a la cantidad de producto inmunogénico que da por resultado el 50% de inhibición de la mortalidad mediada por el virus, se determina al interpolar el valor EC₅₀ sobre el eje x sobre una gráfica de viabilidad/concentración.

30 La comparación del EC₅₀ del producto inmunogénico y el EC₅₀ del control positivo (el subtipo IFN α recombinante utilizado para preparar el producto inmunogénico) permite determinar si el producto inmunogénico muestra menos de 5%, preferiblemente menos de 1% de actividad antiviral.

35 Se puede calcular el producto de Factor de Inactivación EC₅₀/ IFN α EC₅₀: cuando el producto inmunogénico muestra menos de 5%, preferiblemente menos de 1% de actividad antiviral, el Factor de Inactivación es mayor de 20, preferiblemente mayor de 100.

40 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFN α acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que el producto inmunogénico es capaz de neutralizar la actividad antivírica de IFN α en las condiciones de la PRUEBA C citada a continuación. De acuerdo con la invención, se realiza este ensayo para evaluar la capacidad neutralizadora del suero obtenido de ratones inmunizados con el producto inmunogénico. La capacidad neutralizadora se puede determinar al evaluar la viabilidad de las células en presencia del virus de estomatitis vesicular que se replica en células MDBK. Este ensayo también se puede efectuar utilizando células humanas Hep-2C y el virus EMCV.

45 La prueba C se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente método:

50 0.3 a 10 μ g de proteínas totales (según se determina por un ensayo de proteínas Bradford) del producto inmunogénico se inyecta en ratones Balb/c de 6-8 semanas dos veces en 30 días, preferiblemente en el día 0 y día 21. Una muestra de suero se obtiene antes de inmunización (muestra de suero pre-inmunitaria) y entre el día 30 y día 40 (muestra de suero de prueba), preferiblemente en el día 31.

55 25 μ l de muestras de suero pre-inmunitarias y de prueba se colocan en placa en una placa de 96 pozos a una dilución de 1/200 hasta 8 diluciones de 1/200. El control positivo (anti-IFN α policlonal de PBL, Piscataway, NJ, ref.31100-1) se diluye normalmente que es capaz de neutralizar la actividad IFN α de 3125 UI/pozo a 100 UI/pozo en medio Basal (RPMI complementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y Hepes 1 mM) y también se colocan en placas 25 μ l en la placa.

60 Se agrega 25 U/pozo (concentración final) en 25 μ l de medio Basal de IFN α a cada pozo y la placa se incuba durante 60 min a temperatura ambiente.

Se agregan 20000 células MDBK en medio de Ensayo (RPMI complementado con 4% de FBS, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, Hepes 1 mM) a cada pozo y la placa se incuba durante la noche a 37°C, 5% de CO₂.

El virus se diluye a por lo menos 10 TCID₅₀ (10 veces la dilución para matar 50% de células infectadas) en medio de virus (RPMI complementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, Hepes 1 mM). La placa se vacía y 100 µl de virus se agrega a cada pozo antes de incubación durante 24h a 37°C, 5% de CO₂.

5 Al final del cultivo, se evalúa la viabilidad de las células MBDK utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de dichos métodos es el siguiente: se agregan 20 µl/pozo de una solución de MTS/PMS (100 µl de MTS/5 µl de PMS; Promega G5430) a los pozos y la placa se incuba durante otras 4 h a 37°C 5% de CO₂. La placa luego se lee a 490 nm sobre un espectrofotómetro.

10 La viabilidad celular relativa se calcula según lo siguiente:

$$\% = [(OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{virus}}) / OD_{\text{IFN}+\text{virus}}] * 100$$

15 OD_{muestra} significa la densidad óptica de pozo con el suero obtenido del ratón inmunizado con el producto inmunogénico o con el control positivo (anticuerpo anti-IFN policlonal).

OD_{virus} significa la densidad óptica del pozo de control con solo el virus.

20 OD_{IFN+virus} significa la densidad óptica del pozo de control con IFNα y virus.

El valor NC₅₀, que corresponde a la dilución del suero que da por resultado el 50% de neutralización de la mortalidad mediada por el virus expresada como un factor de dilución o unidad/ml de neutralización, se determina al interpolar el valor NC₅₀ sobre el eje x sobre una gráfica de viabilidad/concentración.

25 En la PRUEBA C, un resultado que muestra que el suero obtenido del ratón inmunizado con el producto inmunogénico no protege las células MBDK de la mortalidad significa que el producto inmunogénico tiene la capacidad de inducir anticuerpos dirigidos contra IFNα que neutralizan su actividad antiviral.

30 En una realización, el producto inmunogénico comprende IFNα acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que el producto inmunogénico es capaz de neutralizar por lo menos 50% de la actividad antiviral de IFNα en las condiciones de PRUEBA C. En dicha realización, se puede calcular el NC₅₀. Si la dilución de suero no es capaz de neutralizar por lo menos 50% de la actividad antiviral de IFNα en las condiciones de PRUEBA C, no se puede calcular el NC₅₀ del producto.

35 En una realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFNα acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que la relación IFNα/portador en peso varía desde 0.06 hasta 0.6.

40 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFNα acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que la relación IFNα/portador es 0.1 a 0.5.

En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFNα acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que la relación IFNα/portador es 0.3.

45 En otra realización de la invención, el producto inmunogénico comprende IFNα acoplado a una molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH, en la que la relación IFNα/portador es 0.05, 0.1, 0.2, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.3, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.4, 0.5.

Se puede calcular dicha relación de acuerdo con un método basado en detección de UV y fluorescencia (Prueba E) como se describe en el Ejemplo 10.

50 [Método para obtener el producto inmunogénico]

En una realización de la invención, se obtiene el IFNα quinoide de acuerdo con el siguiente método:

- 55 a) mezclar juntos por lo menos un subtipo IFNα humano recombinante y por lo menos una molécula de proteína portadora con glutaraldehído y bloquear la reacción al agregar un compuesto de extinción seleccionado de (i) un agente de reducción y (ii) un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de lisina y glicina y mezclas de las mismas,
 b) eliminar los compuestos que tienen un peso molecular de menos de 10 kDa, o de menos de 8 kDa
 c) agregar formaldehído;
 60 d) bloquear la reacción con formaldehído al agregar un compuesto de extinción seleccionado de (i) un agente de reducción y (ii) un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de lisina y glicina y mezclas de las mismas,
 e) recolectar dicho producto inmunogénico.

65 En una realización de la etapa a), IFNα y la molécula de proteína portadora tal como por ejemplo KLH en primer lugar se mezclan juntas en las cantidades apropiadas, antes de agregar glutaraldehído.

En una realización, el IFN α y KLH se mezclan en la etapa a) a una relación molar de IFN α : subunidad de KLH que varía desde 10:1 hasta 40:1. En otra realización, IFN α y KLH se mezclan en la etapa a) a una relación molar de IFN α : subunidad de KLH que varía desde 15:1 hasta 25:1. En otra realización, IFN α y KLH se mezclan en la etapa a) a una relación molar de IFN α : subunidad de KLH que varía desde 20:1 hasta 25:1.

5

En una realización de la etapa a), glutaraldehído se utiliza a una concentración final en la mezcla de reacción que varía desde 1 mM hasta 250 mM, preferiblemente desde 20 mM hasta 30 mM, más preferiblemente desde 22.5 mM hasta 25 mM. En una realización de la etapa a), glutaraldehído se incuba con IFN α y KLH durante un periodo de tiempo que varía desde 15 min hasta 120 min, preferiblemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 minutos. En una realización, se agrega glutaraldehído a 22.5 mM durante aproximadamente 45 minutos. De forma ventajosa, la etapa a) de incubación con glutaraldehído se realiza a una temperatura que varía desde 18°C hasta 37°C, preferiblemente desde 18°C hasta 27°C.

10

De acuerdo con una realización, la reacción con glutaraldehído (etapa a) se detiene antes de eliminar los compuestos que tienen un peso molecular de menos de 10 kDa, (etapa b) al agregar un compuesto de extinción, preferiblemente un compuesto de extinción que se selecciona de (i) un agente de reducción y (ii) un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de lisina y glicina y mezclas de las mismas.

15

El agente de reducción puede consistir de una cualquiera de los agentes de reducción conocidos en la técnica que, debido a sus propiedades de reducción, tienen la capacidad de reducir los grupos de imina restantes generados durante tratamiento de aldehído. El agente de reducción se puede seleccionar del grupo que consiste de borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio.

20

De acuerdo con una realización, en las realizaciones en las que dicho compuesto de extinción es un aminoácido, dicho aminoácido consiste de glicina. En algunas realizaciones de la etapa b) en las que la glicina y/o lisina se utilizan para bloquear la reacción con glutaraldehído, el aminoácido seleccionado se utiliza a una concentración final en la mezcla de reacción que varía desde 0.01 M a 1 M, preferiblemente desde 0.05 M hasta 0.5 M, y aún más preferiblemente desde 0.08 M hasta 0.2 M, por ejemplo a 0.1 M como se muestra en los ejemplos aquí. En una realización, incubación con el compuesto de extinción se realiza durante un periodo de tiempo que varía desde 1 minuto hasta 120 minutos, preferiblemente desde 5 minutos hasta 60 minutos, por ejemplo, durante 30 minutos como se muestra en los ejemplos aquí. En otra realización, esta etapa se realiza a una temperatura que varía desde 18°C hasta 30°C, preferiblemente desde 18°C hasta 25°C.

25

30

En la etapa b), se eliminan los compuestos pequeños de menos de 10 kDa que están presentes en la mezcla de reacción. Estos pequeños compuestos abarcan principalmente el exceso de glutaraldehído y el exceso de moléculas del compuesto de extinción que no han reaccionado con IFN α ni con KLH. Se puede realizar la etapa b) de acuerdo con cualesquier técnicas conocidas que permiten eliminar los compuestos de menos de 10 kDa, cuyas técnicas incluyen la diálisis con una membrana de diálisis que tenga un corte de 10 kDa, o mediante filtración utilizando una membrana de filtración que tiene un corte de 10 kDa. Ilustrativamente, la etapa b) puede consistir de una etapa de filtración en flujo tangencial, utilizando una membrana de filtración que tiene un corte de 10 kDa, como se muestra en los ejemplos aquí. El producto retenido en la filtración, que está desprovisto de los compuestos pequeños indeseables, se recolecta al final de la etapa b). Si se desea, la etapa b) puede comprender una etapa preliminar para eliminar los agregados de compuestos eventuales, presentes en la mezcla de reacción obtenida al final de la etapa b). La etapa preliminar puede consistir de una etapa de filtración convencional para eliminar los agregados eventualmente presentes en suspensión en una solución líquida, por ejemplo, una etapa de filtración utilizando una membrana de filtración apropiada, por ejemplo, una membrana de filtración que tiene un tamaño de poros de 0.2 μ m.

35

40

45

En una realización de la etapa c) del método, se agrega formaldehído a una concentración final desde 6 mM hasta 650 mM, preferiblemente desde 25 mM hasta 250 mM. En una realización de la etapa c) del método, se agrega formaldehído durante un periodo de tiempo desde 1h hasta 336 horas, preferiblemente desde 1h hasta 144 horas. En una realización, se aplica formaldehído a una concentración final de 50 a 100 mM, preferiblemente 66 mM durante 20 a 50 horas, preferiblemente 40 horas.

50

En la etapa c), la incubación con formaldehído se realiza preferiblemente a una temperatura que varía desde 30°C a 40°C, por ejemplo, a 37°C como se muestra en los ejemplos aquí.

55

En la etapa d) del método, la reacción con formaldehído se detiene al agregar un compuesto de extinción, preferiblemente un compuesto de extinción que se selecciona de (i) un agente de reducción y (ii) un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de lisina y glicina.

60

El agente de reducción puede consistir en uno cualquiera de los agentes de reducción conocidos en la técnica que, debido a sus propiedades de reducción, reduce los grupos de imina restantes generados durante tratamiento con aldehído. El agente de reducción se puede seleccionar del grupo que consiste de borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio. De acuerdo con una realización, en las realizaciones en las que dicho compuesto de extinción es un aminoácido, dicho aminoácido consiste de glicina. En algunas realizaciones de la etapa b) en las que glicina y/o lisina se utilizan para bloquear la reacción con formaldehído, el aminoácido seleccionado se utiliza a una

65

concentración final en la mezcla de reacción que varía desde 0.01 M hasta 1.5 M, preferiblemente desde 0.05 M hasta 1 M, y aún más preferiblemente desde 0.1 M hasta 0.2 M, por ejemplo a 0.1 M como se muestra en los ejemplos aquí. En una realización, incubación con el compuesto de extinción se realiza durante un periodo de tiempo que varía desde 5 minutos hasta 120 minutos, preferiblemente desde 10 minutos hasta 60 minutos, por ejemplo, durante 30 minutos como se muestra en los ejemplos aquí. En otra realización, esta etapa se realiza a una temperatura que varía desde 18°C a 30°C, preferiblemente desde 18°C a 25°C.

De acuerdo con una realización del método, justo antes de recolectar en la etapa e), se puede realizar eliminación de sustancias que tienen un peso molecular de menos de 100 kDa por el técnico medianamente versado por cualquier técnica conocida en el arte para eliminar las sustancias que tienen un peso molecular de más de 100 kDa desde una solución líquida. En una primera realización, la técnica utilizada es una etapa de filtración que se realiza al utilizar una membrana de filtración que tiene un valor de corte de por lo menos 100 kDa, que abarca una etapa de ultrafiltración o una etapa de filtración tangencial. En una segunda realización, la técnica utilizada consiste en una etapa de filtración tangencial, utilizando una membrana de filtración que tiene un valor de corte de por lo menos 100 kDa. En otra realización, justo antes de la recolección de la etapa e), se puede efectuar la eliminación de las sustancias que tienen un peso molecular menor que 300 kDa, utilizando una membrana de filtración que tiene un valor de corte de por lo menos 300 kDa.

[Composición, emulsión y vacuna que contiene dicha emulsión]

Esta invención se relaciona con una composición que comprende el producto inmunogénico como se describió aquí anteriormente. Esta invención también se relaciona con una formulación del producto de la invención, en el que el producto está dentro de una emulsión. De forma ventajosa, la composición de vacuna de la invención comprende o consiste de dicha emulsión. Dicha emulsión comprende el producto inmunogénico de la invención, un aceite y un surfactante o una mezcla de por lo menos un aceite y por lo menos un surfactante. Preferiblemente, el aceite o la mezcla aceite/surfactante es un excipiente farmacéuticamente aceptable. Más preferiblemente, la mezcla de aceite y surfactante es un adyuvante, incluso más preferiblemente un inmunoadyuvante. El adyuvante preferido es ISA 51. Otro ejemplo de inmunoadyuvante que se puede utilizar es SWE (emulsión aceite en agua a base de escualeno). Otro ejemplo de inmunoadyuvante que se puede utilizar es SWE-a (emulsión aceite en agua a base de escualeno). La emulsión de la invención puede ser una emulsión agua en aceite o una emulsión aceite en agua.

En otra realización, la cantidad del producto inmunogénico de acuerdo con la invención es de más de 0.01% (p/p) y menos de 1% (p/p) del peso total de la dicha emulsión.

[Adyuvantes]

La emulsión o la composición de vacuna de la invención puede comprender adyuvante, especialmente inmunoadyuvantes. En una realización, la cantidad de adyuvante varía desde 0.00001% (p/p) hasta 1%, preferiblemente 0.0001 a 0.1%, más preferiblemente desde 0.001 a 0.01% (p/p) del peso total de la composición de vacuna.

Se puede utilizar cualquier adyuvante adecuado, conocido por los expertos en la técnica, en la composición de vacuna anterior, que incluyen adyuvantes a base de aceite, tales como, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, los adyuvantes a base de micolato (por ejemplo, dimicolato de trehalosa), lipopolisacárido bacteriano (LPS), pepetidoglicanos (es decir, mureinas, micopéptidos o glicoproteínas, tales como N-Opaca, muramil dipéptido [MDP] o análogos de MDP), MPL (lípidos A monofosforilico), proteoglicanos (por ejemplo, extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (por ejemplo, OK432), Biostim.TM (por ejemplo, 01 K2), los "Iscoms" de los documentos EP 109 942, EP 180 564 y EP 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (tales como migliol), aceites vegetales (tales como aceite de cacahuete), liposomas, Pluronic.RTM. polioles, el sistema adyuvante de Ribi (véase, por ejemplo, GB-A-2 189 141) o interleuquinas, particularmente aquellas que estimulan la inmunidad mediada por células. Un adyuvante alterno, que consiste de extractos de *Amycolata*, un género bacteriano del orden los Actinomycetes, se ha descrito en la Patente Estadounidense No. 4,877,612. Alternativamente, también se puede utilizar SWE (3.9% de escualeno, 0.47% de Span, 0.47% de Tween 80 en regulador de citrato) y SWE-a (3.9% de escualeno, 0.47% de Span, 0.47% de Tween 80 en regulador de citrato). Adicionalmente, están disponibles en el comercio mezclas adyuvantes patentadas. El adyuvante utilizado dependerá, en parte, del organismo receptor. La cantidad de adyuvantes que se va a administrar dependerá del tipo y el tamaño del animal. Se pueden determinar fácilmente las dosis óptimas mediante métodos rutinarios.

Los adyuvantes oleosos, adecuados para uso en emulsiones agua en aceite, pueden incluir aceites minerales y/o aceites metabolizables. Se pueden seleccionar los aceites minerales de Bayol®, Marcol® y Drakeol, incluyendo Drakeol® 6VR (SEPPIC, Francia). Se pueden seleccionar los aceites metabolizables de aceite SP (descrito más adelante), Emulsigen (MPV Laboratories, Ralstón, NZ), Montanide 264, 266, 26 (Seppic, SA, Paris, Francia), así como aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete y aceite de soja; aceites animales, tales como los aceites escualeno y escualeno de pescado, y tocoferol y sus derivados.

Adicionalmente, el adyuvante puede incluir uno o más agentes de humectación o dispersión en cantidades de aproximadamente 0.1 a 25%, más preferiblemente aproximadamente 1 a 10%, e incluso más preferiblemente

aproximadamente 1 a 3% en volumen del adyuvante. Particularmente preferidos como agentes de humectación o dispersión son surfactantes. Surfactantes no iónicos útiles incluyen copolímeros de bloque de polioxietileno/polioxipropileno, especialmente aquellos comercializados bajo el nombre comercial Pluronic®. y disponibles de BASF Corporation (Mt. Olive, N.J.). Otros surfactantes no iónicos útiles incluyen ésteres de polioxietileno tales como monooleato de polioxietileno de sorbitán, disponible bajo el nombre comercial Tween 80®, o monooleato de mannida. Puede ser deseable incluir más de uno, por ejemplo, por lo menos dos, agentes de humectación o dispersión en el adyuvante como parte de la composición de vacuna de la invención.

Los adyuvantes adecuados pueden incluir pero no se limitan a surfactantes conocidos por un experto en la técnica, tal como por ejemplo hexadecilamina, octadecilamina, lisolecitina, bromuro dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N'-N-bis(2- hidroxietil-propano di-amina), metoxihexadecil-glicerol, y polioles plurónicos; polianiones, por ejemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, ácido poliacrílico, carbopol; péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo, aimetilglicina, tuftsina, emulsiones de aceite, alumbre, y mezclas de los mismos. Otros adyuvantes potenciales incluyen las subunidades de péptido B de toxina lábil de calor de E. coli o de la toxina de cólera. McGhee, J. R., et al., "On vaccine development," Sem. Hematol., 30:3-15 (1993).

[Surfactantes adicionales]

En las realizaciones de una composición de vacuna de acuerdo con la invención que comprende una emulsión, la composición de vacuna preferiblemente contiene, adicionalmente a la combinación del producto inmunogénico y el uno o más sustancias inmunoadyuvantes oleosas, también uno o más agentes surfactantes. Las realizaciones ilustrativas de agentes surfactantes incluyen monooleato de mannida tal como Montanide® 80 comercializada por Arlacel (SEPPIC, Francia).

En una realización, la cantidad de agente de surfactante varía desde 0.00001% (p/p) hasta 1%, preferiblemente 0.0001 a 0.1%, más preferiblemente desde 0.001 hasta 0.01% (p/p) del peso total de la composición de vacuna.

[Productos liofilizados]

De acuerdo con una realización y para propósitos de almacenamiento, se puede liofilizar el producto o la composición de vacuna de la invención. Por lo tanto, las composiciones de vacuna se pueden presentar en forma secada por congelamiento (liofilizada). En dicha realización, el producto inmunogénico de acuerdo con la invención se combina con una o más sustancias auxiliares de liofilización. Diversas sustancias auxiliares de liofilización son bien conocidas por un experto en la técnica. La liofilización de sustancias auxiliares abarca azúcares como lactosa y manitol.

En dicha realización en la que la composición de vacuna consiste de una composición liofilizada para uso como una emulsión líquida que comprende un agente surfactante, la composición de vacuna preferiblemente comprende una cantidad del producto inmunogénico de acuerdo con la invención de más de 0.1% (p/p) y menos de 10% (p:p) del peso total de dicha composición de vacuna.

[Estabilizadores]

En algunas realizaciones, la vacuna se puede mezclar con estabilizadores, por ejemplo, para proteger las proteínas propensas a degradarse, contra su degradación, mejorar la vida útil de la vacuna, o mejorar la eficiencia del secado por congelación. Los estabilizadores útiles son, entre otros: SPGA (Bovarnik et al., J. Bacteriology, 59; 509 (1950)), carbohidratos, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa; proteínas, tales como albúmina o caseína, o sus productos de degradación; mezclas de aminoácidos, tales como lisina o glicina, y reguladores, tales como fosfatos de metal alcalino.

[Ruta de administración]

La composición de vacunas de acuerdo con la invención se puede administrar al sujeto que se va inmunizar mediante cualquier método convencional que incluye, mediante inyección inyectable, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea; o mediante suministro tópico, tal como por ejemplo mediante suministro transdérmico. El tratamiento puede consistir de una única dosis o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo.

[Forma de dosificación]

Las formas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones o dispersiones estériles y polvos estériles para preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La prevención contra la contaminación por microorganismos se puede efectuar al agregar a la composición de vacuna conservadores, tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y otros similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio, para reducir el dolor durante la inyección. Se puede efectuar la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso, en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

De acuerdo con una realización, se solubiliza en agua una composición de vacuna liofilizada de la invención, para la inyección, y se mezcla suavemente; luego se agrega un inmunoadyuvante, preferiblemente ISA 51; se mezcla suavemente la mezcla para que se emulsifique y se carga en una jeringa adecuada. Por lo tanto, esta invención también se refiere a un dispositivo médico, que incluye una jeringa llena o precargada con una composición de vacuna de la invención. Idealmente se prepara la emulsión extemporáneamente. Sin embargo, se puede almacenar la jeringa que contiene la emulsión durante menos de 10 horas a 2-8°C. En este caso, se debe permitir que se caliente la emulsión antes de inyectar, mediante fricción entre las manos.

10 [Rango de dosis unitaria]

Otro objeto de la invención es una unidad de dosificación que una cantidad del producto inmunogénico que varía desde más de 30 mcg a 1000 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 1000 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 750 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 500 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 450 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 400 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 350 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 300 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 1000 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 750 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta a 500 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 450 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 400 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 350 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 300 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 250 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 240 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 200 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 150 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 120 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 100 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 hasta 400 mcg.

En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 60 mcg hasta 240 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 60 mcg hasta 120 mcg.

En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico de 60 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico de 120 mcg. En otra realización, la unidad de dosificación comprende una cantidad del producto inmunogénico de 240 mcg.

[Kit y Dispositivo médico]

Esta invención también pertenece a un kit que comprende:

- 1 frasco (Frasco Número 1) que contiene el producto inmunogénico de la invención, normalmente de 3 mL;
- 1 frasco (Frasco Número 2) que contiene adyuvante, preferiblemente ISA51; este frasco es capaz de contener 3 mL de adyuvante y puede ser un contenedor de 8 mL;
- 1 jeringa, normalmente una Braun Injekt-F® de 1 mL;
- 1 aguja (Número de Aguja 1) para preparación de emulsión; esta aguja es preferiblemente una aguja de 20G;
- 1 aguja (Número de Aguja 2) para inyección, preferiblemente inyección intramuscular; esta aguja es preferiblemente una aguja de 23G.

Esta invención también pertenece a un método para preparar una vacuna del kit, que comprende:

- 5 (1) extraer hasta 0.4 ml de adyuvante desde el Frasco Número 2. Descargar este contenido de jeringa en el Frasco Número 1 que contiene 0.4 ml de producto inmunogénico.
- (4) bombear arriba y abajo el contenido del frasco total una cantidad suficiente de veces para emulsificar el contenido, normalmente 30 veces y finalmente extraer la emulsión completa.
- 10 Antes de inyección, preferiblemente se cambia el Número de Aguja 1 por el Número de Aguja 2 y se purga el aire de la jeringa.

En una realización, dicho kit comprende:

- 15 - 1 frasco (Frasco Número 1) que contiene 0.4 ml del producto inmunogénico de la invención;
- 1 frasco (Frasco Número 2) que contiene por lo menos 0.4 ml de adyuvante, preferiblemente ISA51;
- 20 - 1 jeringa, normalmente una Braun Injekt-F® de 1 mL;
- 1 aguja (Número de Aguja 1) para preparación de emulsión; esta aguja es preferiblemente una aguja de 20G;
- 1 aguja (Número de Aguja 2) para inyección, esta aguja es preferiblemente una aguja de 23G.

25 En otra realización, el producto inmunogénico está en una forma liofilizada. Por lo tanto, el kit comprende:

- 1 frasco (Frasco Número 1) que contiene el producto liofilizado de la invención, normalmente de 3 mL;
- 30 - 1 frasco (Frasco Número 2) que contiene agua para inyección normalmente de 2 mL;
- 1 frasco (Frasco Número 3) que contiene adyuvante, preferiblemente ISA51; este frasco es capaz de contener 3 mL de adyuvante y puede ser un contenedor de 8 mL;
- 35 - 1 jeringa, normalmente una Braun Injekt-F® de 1 mL;
- 1 aguja (Número de Aguja 1) para preparación de emulsión; esta aguja es preferiblemente una aguja de 20G;
- 40 - 1 aguja (Número de Aguja 2) para inyección, preferiblemente inyección intramuscular; esta aguja es preferiblemente una aguja de 23G.

Esta invención también pertenece a un método para preparar una vacuna del kit, que comprende:

- 45 (1) inyectar agua para inyección desde el Frasco Número 2 en el Frasco Número 1 al utilizar la jeringa conectada al Número de Aguja 1;
- (2) girar gentilmente el Frasco Número 1 durante 1-5 minutos hasta completar la solubilización de la preparación;
- (3) con la misma jeringa y aguja, extraer el adyuvante desde el Frasco Número 3. Descargar este contenido de jeringa en el Frasco Número 1.
- 50 (4) bombear arriba y abajo el contenido del frasco total una cantidad suficiente de veces para emulsificar el contenido, normalmente 30 veces y finalmente extraer la emulsión completa.

Esta invención también se relaciona con el dispositivo médico que es la jeringa llena o precargada con la composición, emulsión o vacuna de la invención.

En una realización, dicha jeringa es una jeringa de cámara doble, en la que una cámara comprende una solución con el producto inmunogénico de la invención y la otra cámara comprende el adyuvante.

60 La invención también se relaciona con un dispositivo médico que comprende un frasco o una cápsula precargada con el producto de la invención o con la composición de vacuna de la invención.

En una realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde más de 30 mcg a 1000 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 1000 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 750 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una

65

cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 500 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 450 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 400 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 350 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 360 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35 mcg hasta 250 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 1000 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 750 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta a 500 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 450 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 400 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 350 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 300 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 250 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 240 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 200 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 150 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 120 mcg. En otra realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico por administración es desde 60 mcg hasta 100 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 hasta 400 mcg.

En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 60 mcg hasta 240 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico que varía desde 60 mcg hasta 120 mcg.

En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico de 60 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico de 120 mcg. En otra realización, el dispositivo médico comprende una cantidad del producto inmunogénico de 240 mcg.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Porcentaje de muestras de suero de pacientes inmunizados que muestran actividad de neutralización de IFN α durante informe provisional.

Figura 2: Evolución diferencial de los genes inducidos por IFN en pacientes tratados contra pacientes con placebo. De los 11 pacientes que exhiben niveles incrementados de expresión de gen inducida por IFN en el valor inicial, 8 fueron tratados con el producto inmunogénico y 3 recibieron inyecciones de placebo. Los niveles de 250 genes inducidos por IFN que muestran los mayores niveles de sobreexpresión en pacientes de SLE, se evaluaron utilizando microformaciones de alta densidad. Los resultados se ilustran como la media de $\log_2(\text{nivel de expresión a V1}) - \log_2(\text{nivel de expresión a V6})$. El valor p se calculó utilizando una prueba t de Student.

Figura 3: Títulos de los anticuerpos que se unen a IFN en pacientes tratados con firma de IFN positiva o negativa en el valor inicial, contra pacientes que recibieron placebo. Los asteriscos indican valores $p < 0.05$.

Figura 4: Evolución diferencial de genes inducidos por IFN en pacientes tratados con firma IFN positiva o negativa en el valor inicial, contra pacientes de placebo, entre V10 y V0 o entre V11 y V0. Los resultados se ilustran como la media de Delta Log (Expresión de Gen). Los asteriscos indican valores $p < 0.05$.

Figura 5: Evolución de los valores C3 en suero en pacientes tratados con firma de IFN positiva en el valor inicial y en pacientes que recibieron placebo. Los asteriscos indican valores $p < 0.04$.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación del producto inmunogénico

Se extrae hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) de la linfa de moluscos gasterópodos marinos *Megathura crenulata* y luego se purifica bajo condiciones GMP. Los resultados de ensayos de estabilidad realizados en condiciones de almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C mostraron que la vida útil del KLH purificado es de 36 meses a 2-8 °C.

ES 2 644 824 T3

Se produce IFN α 2b humano recombinante en E. coli bajo condiciones GMP.

5 Se producen lotes del producto de la invención en 350 μ g IFN α a escala utilizando los procesos de fabricación desarrollados adelante.

a) Conjugación con glutaraldehído

10 Se agrega KLH filtrado a la solución IFN α 2b (IFN α 2b en 70 mM hidrogen fosfato di-sodio pH 7.8) con una relación de IFN α :KLH de 20:1, (que corresponden una relación molar de 20 monómero de IFN α para 1 subunidad de KLH) basado en concentración UV.

15 La conjugación se lleva a cabo con glutaraldehído (agregado para alcanzar 22,5 mM de concentración final en el medio de reacción) y borato pH 9 (agregado para alcanzar 28.5 mM de concentración final en el medio de reacción), para obtener un pH de 8.5.

Esta solución en pH 8.5 se mezcla luego durante 45 min a $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

20 b) Apagado con glicina

La reacción se apaga con glicina 0,1 M durante 30 minutos.

c) Primera filtración de flujo tangencial (1 TFF)

25 Se realiza el primer TFF con un sistema Pall Minim II TFF y una membrana de Polietersulfona de 0.02 m² con un corte de peso molecular de 10 kDa desinfectado con NaOH 0.5 M y equilibrada con el regulador de trabajo (hidrogen fosfato de disodio 70 mM pH 7.8).

30 La solución apagada se clarifica luego mediante 0.22 μ m-filtración. El intermedio se diluye dos veces en el regulador de trabajo y luego se diafiltra mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y 12 volúmenes de regulador de trabajo. El retentato se cosecha y se almacena durante menos de 20 horas.

d) Inactivación con formaldehído

35 Se agrega formaldehído al retentato para alcanzar una concentración final de 66.6 mM utilizando una bomba peristáltica. La reacción de inactivación se realiza durante 40 horas en una incubadora a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con una mezcla diaria de la solución con un agitador magnético.

40 e) Apagado con glicina

La reacción se apaga luego con 0.1 M de glicina durante 30 minutos.

f) Segunda filtración tangencial (TFF 2)

45 Se realiza el segundo TFF con un sistema Pall Minim II TFF y una membrana de Polietersulfona de 0.02 m² con un corte de peso molecular de 100 kDa desinfectado con NaOH 0.5 M y equilibrada con el regulador de formulación (hidrogen fosfato di-sodio 70 mM pH 7.8).

50 La solución apagada se clarifica mediante filtración de 0.2 μ m. El intermedio se concentra para tener un volumen tangencial de partida de \approx 900 mL y luego se filtra mediante TFF con 12 volúmenes de regulador de formulación (regulador de fosfato 70 mM) para eliminar los homopolímeros de bajo peso molecular de IFN α y los reactivos no reactivos. El retentato se cosecha y luego se diluye hasta una concentración teórica de 300 μ g/mL con base en la determinación de concentración mediante el ensayo de proteína Bradford y luego se filtra 0.2 μ m para obtener el producto inmunogénico de la invención.

55 Ejemplo 2: Antigenicidad del producto

5 Se lleva a cabo un ELISA de captura anti IFN α /KLH como sigue. En resumen, se recubre una placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura: anticuerpo anti-KLH policlonal de conejo y se bloquea con un regulador de bloqueo (tal como caseína al 2% en PBS, por ejemplo) durante 90 minutos a 37°C. La placa se incuba durante 90 minutos a 37°C, la placa con una serie de diluciones del producto inmunogénico de 250 ng/ml hasta 8 diluciones dobles o con controles negativos tales como KLH e IFN α . Un anticuerpo de detección tal como por ejemplo un anticuerpo anti-IFN α biotinilado se agrega adicionalmente durante 90 minutos. Finalmente, la placa se incuba estreptavidina-HRP durante 30 min a 37°C y se desarrolla el complejo con una solución de sustrato de diclorhidrato o-fenilendiamina (OPD) durante 30 minutos. Después de detener la reacción enzimática, se determina el color resultante mediante métodos espectrofotométricos en 490 nm.

10 Esta prueba confirma que el producto comprende IFN α que es antigénico, es decir, reconocido por el anticuerpo anti-IFN α y que dicho IFN α se acopla a KLH.

15 Ejemplo 3: Inmunogenicidad del producto (PRUEBA A)

Se inyectan 4 μ g de proteínas totales del producto según se determina mediante el ensayo de proteínas Bradford a 7 ratones Balb/c de 6 a 8 semanas en el día 0 y día 21.

20 En el día 31, los ratones se desangran y se cultiva el suero.

Se lleva a cabo ELISA anti-IFN α en suero cosechado y pre inmune como sigue:

-Se recubre una placa de 96 pozos 100 ng de IFN α -2b y se incuba durante la noche a 2°C - 8°C,

25 -Se agrega un regulador de bloqueo durante 90 minutos a 37°C,

-Se agrega producto inmunogénico en una dilución de 1/2500 hasta por lo menos 8 diluciones dobles y la placa se incuba durante 90 minutos a 37°C,

30 -La placa se incuba con un anticuerpo etiquetada con inmunoglobulina de ratón tal como un anticuerpo conjugado con HRP durante 90 minutos a 37°C,

-El ELISA se desarrolló con una solución de sustrato de clorohidrato-fenilendiamina (OPD). Después de detener la reacción enzimática, la intensidad del color resultante se determina por métodos espectrofotométricos en 490 nm.

35 Esta prueba demostró que, en los 7 ratones, la inmunización con el producto inmunogénico condujo a la presencia de títulos de anticuerpos anti-IFN α .

40 Ejemplo 4: Actividad Residual del producto (PRUEBA B)

Este ensayo se basa en el efecto protector de IFN α en el efecto citopático (CPE) del Virus de Estomatitis Vesicular (VSV) en células de riñón de bovino Madin-Darby (MDBK).

45 El producto inmunogénico y el IFN α 2b recombinante utilizado para preparar el producto inmunogénico (control positivo) se diluyen en por lo menos 500 ng/ml y por lo menos 1000 U/ml respectivamente en medio Basal (RPMI complementado con 2 mM de glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 1 mM Hepes). 50 μ l del producto inmunogénico y el control positivo se colocan en una placa de 96 pozos se diluyen en serie de diluciones dobles en medio Basal. Se agregan 2 $\times 10^4$ células MDBK en cada pozo en 50 μ l de Medio Celular (RPMI complementado con SFB al 4%, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 1 mM Hepes) y la placa se incuba durante la noche a 37°C, al CO₂ al 5%. El virus se diluye luego en medio Basal hasta por lo menos 10 TCID₅₀ (infección de cultivo de tejido dosis 50:10 veces la dilución hasta matar el 50% de células infectadas). La placa se vacía y se agrega 100 μ l del virus diluido. La placa se incuba luego durante la noche a 37°C, 5% CO₂.

55 Al final del cultivo, se agrega 20 μ l/pozo de una solución de MTS/PMS (100 μ l MTS/5 μ l PMS; Promega G5430) a los pozos y la placa se incuba durante otras 4 h a 37°C CO₂ al 5%. La placa se lee luego en 490 nm en un espectrofotómetro.

El porcentaje de actividad antivírica del producto inmunogénico se calcula y para los dos lotes del producto probado, la actividad antivírica fue menos del 1% de la actividad antivírica del IFN α .

Ejemplo 5: Capacidad de neutralización del producto (PRUEBA C)

5

Se evalúa la capacidad de neutralización del producto al evaluar la viabilidad celular en presencia del virus de estomatitis vesicular que replica en células MDBK.

10

Se inyectan 4 μ g de proteínas totales (según se determina mediante un ensayo de la proteína Bradford) del producto inmunogénico en ratones Balb/c de 6-8 semanas en el día 0 y en el día 21. Se obtuvo una muestra de suero antes de inmunización (muestra de suero pre inmunitario) y en el día 31 (muestra de suero de prueba).

15

Se colocan en placas 25 μ l de suero de prueba y pre inmunitario en una placa de 96 pozos en una dilución de 1/200 hasta 8 diluciones de 1/200. El control positivo (anti-IFN α policlonal de PBL, Piscataway, NJ, ref.31100-1) se diluyó de 3125 UI/pozo hasta 100 UI/pozo en medio Basal (RPMI complementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 1 mM hepes) y también se colocan 25 μ l en la placa.

20

Se agrega 25 U/pozo (concentración final) en 25 μ l de medio basal de IFN α a cada pozo y la placa se incuba durante 60 min a temperatura ambiente.

25

Se agregan 20000 células MDBK en un medio de ensayo (RPMI complementado con FBS al 4%, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 1 mM hepes) a cada pozo y la placa se incubó durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%.

30

El virus se diluye a por lo menos 10 TCID₅₀ (10 veces la dilución para matar el 50% de células infectadas) en medio de virus (RPMI complementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 1 mM hepes). La placa se vacía y se agrega 100 μ l de virus a cada pozo antes de incubación durante 24h a 37 °C, CO₂ al 5%.

35

Al final del cultivo, se agrega 20 μ l/pozo de una solución de MTS/PMS (100 μ l MTS/5 μ l PMS; Promega G5430) a los pozos y la placa se incuba durante otras 4 h a 37°C CO₂ al 5%. La placa luego se lee en 490 nm en un espectrofotómetro.

El NC se calcula para todas las 7 pruebas: media NC = 253789 UI/ μ l (SEM = 172526), que demuestra que todo el suero comprende anticuerpos anti-IFN α capaces de neutralizar la actividad antivírica de IFN α .

Ejemplo 6: Ejemplos de composiciones y vacunas que comprenden el producto inmunogénico

Una composición ilustrativa que comprende el producto inmunogénico se describe en la tabla 1.

Tabla 1

40

Componentes	Cantidad
Producto de la invención	160 μ g
fosfato de disodio	8.95 mg
Dihidrogen Fosfato de disodio	805 μ g
Volumen total	0.4 ml

Una vacuna ilustrativa que comprende el producto inmunogénico se describe en la tabla 2.

Tabla 2.

45

Emulsión	
Componentes	Cantidad
Producto de la invención	160 μ g
fosfato de disodio	8.95 mg
Dihidrogen Fosfato de disodio	805 μ g
Drakeol 6VR (aceite mineral)	0.30 g

ES 2 644 824 T3

Montanide 80 (monooleato de manida)	0.04 g
Volumen total	0.8 ml

Ejemplo 7: Ensayo clínico

Se llevó a cabo un ensayo clínico utilizando la composición de vacuna como se describe en la tabla 2.

5

Diseño del estudio:

Se realizan 3 o 4 administraciones del producto en el día 0, día 7 y día 28 o en el día 0, día 7, día 28 y día 84 en adultos sometidos a SLE.

10

Se prueban las siguientes dosis del producto: 30 mcg, 60 mcg, 120 mcg y 240 mcg.

Población de estudio:

15

28 pacientes hombres o mujeres de edades entre 18 y 50 años, con enfermedad activa SLE (SLEDAI 4-10) leve a moderada a pesar de recibir tratamiento. Se establece una firma de gen de interferón de control normal en 48 voluntarios saludables. Se estimula PBMC de 18 de los 48 voluntarios saludables in vitro con interferones de tipo I con el fin de identificar una firma de interferón en las matrices de alta densidad. Se establece una firma SLE al comparar las firmas entre voluntarios saludables y pacientes SLE en valores iniciales.

20

Se realizó un análisis provisional en los pacientes vinculados en los primeros tres grupos, es decir que han recibido dosis de 30, 60 o 120 mcg o placebo.

Tabla 3. Demografía para pacientes vinculados (análisis provisional)

25

Resumen de estadísticas	30mcg (N=3)	60mcg (N=6)	120mcg (N=6)	Placebo (N=5)	Total (N=20)
Edad (años)					
Media (DE)	36.0 (9.85)	39.3 (3.98)	34.2(12.12)	38.6(11.52)	37.1 (9.28)
Mediana	33	38	32.5	43.0	37.5
Sexo, n%					
Hombre	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Mujer	3 (100.0)	6 (100.0)	6 (100.0)	5 (100.0)	20 (100.0)
Raza, n%					
Blanco-Caucásico	3 (100.0)	6 (100.0)	6 (100.0)	5 (100.0)	20 (100.0)
SLEDAI-2000					
Media	8.67(1.15)	7.50(2.81)	6.00(2.19)	8.80(1.09)	
Mediana	8.00	8.50	6.00	8.00	
ADN ab anti-ds					
Media(DE)	53.93(58.22)	61.25(113.46)	140.55(242.63)	88.70(113.62)	
Mediana	33.10	15.45	23.60	40.90	
Duración de la enfermedad					
Media(DE)	10.0(2.18)	8.9 (8.82)	7.3 (5.99)	5.9 (4.75)	7.9(6.11)
Mediana	11.0	6.1	6.1	3.6	6.4
Corticosteroides concomitantes	100%	66.7%	83.3%	100%	

Tabla 4. Demografía para pacientes vinculados (análisis final)

Medida		30µg (N=3)	60µg (N=6)	120µg (N=6)	240µg (N=6)	Placebo (N=7)
Edad (a)	Media ± DE	36.0 ± 9.8	39.3 ± 4.0	34.2 + 12.1	34.8 ± 10.8	40.1 ± 10.2

	Mediana Rango	33 28-47	38 35-46	33 19-50	36 20-50	43 20-50
Sexo						
Etnia femenina	n (%)	3 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	7(100)
Blanco- Caucásico	n (%)	3 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6(85.7)
Asiático	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1(14.3)
Peso (kg)	Media ± DE Mediana Rango	69.7 ± 11.9 75 56-78	67.8 ± 10.0 63 58-81	59.2 ± 7.4 59 51-71	70.0± 15.9 65 54-97	57.4 ± 14.8 55 46-90
Estatura (cm)	Media ± DE Mediana Rango	162.3 ± 6.4 165 155-167	165.0± 5.1 166 159-170	164.0± 5.5 165 156-172	162.8± 8.6 163 152-172	162.7±5.8 163 153-170
Índice de grasa corporal (kg/m ²)	Media ± DE Mediana Rango	26.6± 6.0 27 21-32	25.0± 4.3 24 21-32	22.1± 3.5 21 18-28	26.7± 7.2 25 20-40	21.7 ± 5.2 20 17-33
Duración de la enfermedad (a)	Media ± DE Rango	9.9±2.2 7-11	8.9 ±8.8 1-23	7.2±6.0 0-18	11.8±8.4 2-21	6.5±4.0 1-11
Índice SLEDAI- 2000	Media ± DE Rango	8.7±1.2 8-10	7.5±2.8 4-10	6.0±2.2 4-10	6.0±1.8 4-8	8.4±1.1 7-10
Medicamentos en valores iniciales, n%						
Glucocorticoides	n (%)	3(100.0)	4(66.7)	5(83.3)	3(50.0)	6(85.7)
Aminoquinolina	n (%)	0(0.0)	4(66.7)	3(50.0)	5(83.3)	5(71.4)
Metrotexato	n (%)	(0.0)	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	1(14.3)
Azatiopina	n (%)	(0.0)	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	0(0.0)

Resultados

Seguridad y tolerabilidad de la vacuna

5

Se han reportado dos ataques de lupus como relacionados con SAE. Los primeros fueron en el grupo de placebo. Los otros ocurrieron después de la primera inyección de IFN-K 240 mcg en un paciente que ha detenido espontáneamente su terapia con corticoesteroides dos días después de la inyección. Esta interrupción abrupta del tratamiento con corticosteroides probablemente participa en la ocurrencia de los ataques. Se realizan análisis de seguridad provisionarios mediante una Junta de seguridad independiente. No se han detectado cambios clínicamente significativos en los parámetros de laboratorio (hematología, bioquímica, orina).

10

Inmunogenicidad de la vacuna

15

Se miden títulos de anticuerpos anti-IFN α mediante ELISA de muestras de suero obtenidas de pacientes.

Se lleva a cabo un ELISA anti-IFN α como se describió anteriormente.

Los resultados muestran que se detectaron títulos de anticuerpos anti-IFN α en todos los grupos tratados con el producto inmunogénico empezando en el día 28.

5 Actividad de neutralización de la vacuna

Se evalúa la actividad de neutralización in vitro utilizando el siguiente método:

10 50 μ l de muestras de suero obtenidas de pacientes se suero se cultivaron en una placa de 96 pozos en una dilución de 1/200 hasta 8 diluciones de 1/200.

15 El control positivo (anti-IFN policlonal de PBL Piscataway, NJ, 31100-1) se diluye de 100 ng/pozo a 3.125 ng/pozo y se agregó 50 μ l a la placa. Las diluciones se llevaron a cabo en medio Basal (RPMI complementado con 2 mM glutamina, 1 mM piruvato de sodio y 1 mM de hepes).

Se agregó 10 U/pozo (concentración final) de IFN α 2b a cada pozo y la placa se incubó durante 60 min a temperatura ambiente.

20 Se agregaron 30000 células MDBK en medio de ensayo (RPMI complementado con FBS al 4%, 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 1 mM Hepes) a cada pozo y la placa se incubó durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%.

25 El virus se diluyó a por lo menos 10 TCID₅₀ (10 veces la dilución para matar el 50% de células infectadas) en medio de virus (RPMI complementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 1 mM hepes). La placa se vacía y se agrega 100 μ l de virus a cada pozo antes de incubación durante 24h a 37°C, CO₂ al 5%.

Al final del cultivo, se agregaron 20 μ l/pozo de una solución de MTS /PMS (100 μ l MTS/5 μ l PMS; Promega G5430) a los pozos y la placa se incuba durante otras 4 h a 37°C CO₂ al 5%. La placa se lee luego en 490 nm en un espectrofotómetro.

30 Los resultados del informe provisional de mostraron que ninguno de los sueros de los pacientes tratados con 30 mcg en el producto inmunogénico presenta anticuerpos anti-IFN α que tienen una capacidad de neutralización en el día 168 después de inmunización, mientras que el suero de pacientes tratados con 60 mcg del producto inmunogénico presentan anticuerpos anti-IFN α p, que tienen una capacidad neutralizante en el día 168 (Figura 1).

35 Más aún, los resultados del informe final mostraron que se detectó una actividad de neutralización en el 50% de los sujetos tratados con 60 μ g o 120 μ g del producto inmunogénico y en 80% de sujetos tratados con 240 μ g del producto inmunogénico (tabla 5)

Tabla 5

Dosis (mcg)	Número de respondedor (%)	Mediana de NC50 en pico (Dil-1)
30	0	0
60	50	390
120	50	733
240	80	316

40 Estos resultados demostraron que el tratamiento con más de 30 mcg del producto inmunogénico es necesario para tener una neutralización in vivo de IFN α .

Ejemplo 8: Análisis transcriptómico

45 Se cosechó PBMC en diversos momentos antes y después de inyección del producto inmunogénico. Para este análisis provisional, se extrajo ARN total en muestras V1 (día 0) y V6 (día 38 después de la primera inyección), etiquetados de acuerdo con el protocolo estándar Affymetrix, e hibridado en matrices Genechip HGU133 Plus 2.0. Se realizaron análisis estadísticos en GeneSpring después de normalización de RMA (análisis de micromatriz robusta) de las muestras.

50 Se realizaron algoritmos de agrupación no supervisados sobre muestras iniciales, y se agruparon los pacientes en dos categorías: aquellos con (n=11) y aquellas sin (n=7) la presencia de una "firma de interferón" en valores iniciales, es

decir, la sobre expresión espontánea de genes inducida por el interferón tipo I (los genes IFN - inducidos se identificaron experimentalmente, con base en análisis de micromatrices PBMC de control IFN -estimulados). No sorprendentemente, los títulos de ADN fueron significativamente mayores en los pacientes con la firma (media \pm EEM: 131.1. \pm 50,1 UI/ml), en comparación con los pacientes sin (media \pm -EEM: 44.7 \pm 33.3, $p=0.006$ por prueba Mann-Whitney). Se encuentran que los anticuerpos anti-IFN α medibles en 8 muestras de seguimiento de 8 pacientes con una firma IFN en valores iniciales quienes recibieron el producto inmunogénico, mientras que este solo era el caso de 2 de 6 pacientes sin la firma IFN tratada con el producto inmunogénico, y ninguno de los 4 individuos tratados con placebo ($p=0.002$ por prueba de Chi-cuadrado). De los 11 pacientes con una firma IFN inicial, 2 recibieron la dosis de 30 mcg, 1 recibió la dosis de 60 mcg, 5 recibieron la dosis de 120 mcg y 3 fueron tratados con una inyección de placebo. Los cambios observados en la expresión de los genes IFN-inducidos entre V1 y V6 fueron significativamente diferentes en los pacientes tratados con el producto inmunogénico, en comparación con los pacientes tratados con el placebo (Figura 2).

Este resultado sugiere que el producto inmunogénico tiene un efecto sobre la expresión de genes IFN-inducidos in vivo.

EJEMPLO 9: Firma IFN y respuesta a tratamiento con producto inmunogénico

La “firma interferón” en valores iniciales se midió en 28 pacientes con SLE leve a moderada del ejemplo 7. La firma de interferón (IFN-firma) corresponde a una calificación calculada utilizando 21 genes IFN-inducidos y se describen en Yao et al, Arthritis & Rheumatism, 2009, 60 (6): 1785-1796. La medición de la firma de interferón se hizo como se describió en el ejemplo 8.

En los 28 pacientes SLE del ejemplo 7, 19 mostraron una firma de interferón positiva y 9 una firma de interferón negativo en valores iniciales.

Firma de interferón y actividad de enfermedad SLE

Los títulos de anticuerpos ADNds y niveles de suero de C3 se midieron como índices de actividad de enfermedad en ambos grupos de pacientes.

Se determinaron los títulos de anticuerpos ADNds utilizando el kit anti-ADN DPC 2(PIKADD-4) de Diagnostic Products Corporation.

Se determinaron los niveles de suero C3 utilizando el kit Complement C3 (Kit # 446450) de Beckman Coulter.

Tabla 6: Índices de actividad de enfermedad SLE2

	Firma IFN positivo para SLE	Firma IFN negativa para SLE	Valor p
dsADN Ab	147 \pm 57	44 \pm 93	< 0.05
C3	834 \pm 55	1199 \pm 114	< 0.005

Como se muestra en la tabla 6 anterior, los pacientes con SLE con firma de interferón positiva en valores iniciales tienen índices biológicos de mayor actividad de enfermedad.

Firma de Interferón y respuesta al tratamiento con productos inmunogénicos de la invención

Los efectos del tratamiento con el producto inmunogénico de la invención como se describe en el ejemplo 7 se compararon con pacientes SLE con IFN-firma positiva y negativa en valores iniciales.

Respuesta anti-IFN-alfa

Se midieron los títulos de anticuerpo de IFN-Unión como se describe en el ejemplo 7 en V6 (día 38), V10 (día 112) y V11 (día 168 después de inmunización).

Los resultados mostraron que los pacientes SLE con firma de interferón positiva producen diez más anticuerpos IFN-unión en respuesta al producto inmugenico de la invención que pacientes SLE con firma de interferón negativa en valores iniciales (Figura 3).

Genes IFN - inducidos

5 Se mide la evolución de la expresión de genes IFN - inducidos entre V0 y V10 o V11 en los pacientes tratados con IFN firma positivo o negativo en valores iniciales y en pacientes tratados con placebo.

10 Los resultados mostraron que en comparación con pacientes tratados con placebo y con IFN-firma negativa, los efectos de la terapia con el producto inmunogénico de la invención en genes IFN inducidos fueron fuertemente y significativamente diferentes en V10 y V11 en pacientes SLE IFN-firma positivos (Figura 4).

Complemento C3

15 Se miden los valores C3 en suero en pacientes tratados y en pacientes que reciben placebo en V-1 (30 días antes de inmunización), V0 (día de inmunización), V7 (día 56), V10 (día 112) y V11 (día 138 después de inmunización) como se describió anteriormente.

20 Los resultados muestran que existe un aumento significativo en niveles C3 en pacientes tratados-versus placebo. Más aún, existe un aumento significativo en los niveles C3 en pacientes SLE IFN-firma positivo tratados con el producto inmunogénico de la invención (Figura 5).

Ejemplo 10: Determinación de la relación IFN α /KLH en el producto de la invención

25 Con el fin de evaluar la cantidad de IFN α y KLH en el producto de la invención, se desarrolla un método de cuantificación basado en detección de fluorescencia y UV. Los productos de la invención se fabrican con dos etiquetas fluorescentes, cada una específica de IFN α o KLH. Después de análisis por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), se determinó la cuantificación de IFN α y KLH mediante integración de señal UV en 220 nm y señal fluorescente (FLD) específica para etiqueta IFN α o etiqueta KLH. Este método permite calcular la relación en peso de IFN α /KLH.

30 a) Materias primas de etiquetado:

Se acoplan etiquetas fluorescentes en grupos sulfhídrico con el fin de preservar los grupos aminos utilizados durante la fabricación del producto.

35 El etiquetado se realiza en 70 mM de regulador de fosfato de sodio pH 7 a temperatura ambiente durante 3 h. Se etiqueta KLH con 200 equivalente molar a Atto565-maleimida (18507, Sigma) y IFN α con 100 equivalente molar de maleimida fluoresceína (46130, Pierce). Las proteínas etiquetadas (KLH-atto565 IFN-fluoresceína) se filtran luego en una columna Zeba (corte 7kDa, Thermo Scientific, 89893) acondicionado con 70 mM de regulador de fosfato pH 7,8 con el fin de eliminar las etiquetas sin reaccionar.

40 b) Fabricación del producto:

Luego se utilizan materias primas etiquetadas para fabricar productos etiquetados con el mismo proceso como en el ejemplo 1 con filtración de diálisis en lugar de filtración de flujo tangencial.

45 c) Fabricación de estándares de homopolímeros KLH e IFN α

Para el método analítico cuantitativo, se fabrican estándares de homopolímeros. Los estándares de homopolímeros IFN α etiquetados se fabrican con el mismo proceso que en el ejemplo 1 pero con 70 mM de regulador de fosfato pH 7,8 en lugar de filtración por diálisis y KLH en lugar de filtración de flujo tangencial.

50 Se fabrica estándares de homopolímeros KLH etiquetados con el mismo proceso como en el ejemplo 1 pero con 70 mM de regulador fosfato pH 7,8 en lugar de filtración por diálisis y IFN α en lugar de filtración de flujo tangencial.

55 d) Método análisis por cromatografía de exclusión de tamaño

Los lotes se analizan luego mediante SEC con detección fluorescente específica y UV.

Se inyecta 60 µl de la muestra en columnas SEC5 (1000Å) SEC3 (300Å) conectados en serie (Agilent, 5190-2536, 5190-2511), se realizó elución con PBS durante 35 min con detección UV en 220 nm y detección fluorescente específica (para IFNα-fluoresceína o KLH-Atto565), como se describe la tabla 7.

5 Tabla 7: Excitación y emisión de longitud de onda utilizada para IFNα-fluoresceína o KLH-Atto565

Detección específica fluorescente	Longitud de onda nm	
	Excitación	Emisión
IFNα-fluoresceína	490	520
KLH-Atto565	570	600

Se calculan las señales fluorescentes (FLD) y UV al integrar el área bajo los picos del cromatograma entre 0 y 20 minutos.

10 Para validar este método, se realizan experimentos preliminares para demostrar:

-Especificidad de señal fluorescente (no se observa sobre posición de señal entre las dos proteínas etiquetadas),

15 -Para cada lote fabricado (producto de la invención, homopolímeros etiquetados de KLH e IFNα), se obtienen perfiles UV similares mediante SE-HPLC,

- No se observa apagado de la señal fluorescente debido a la fabricación,

20 - Las señales FLD fueron lineales y proporcionales a las señales de UV.

Contribución de UV y IFNα etiquetado en el quinoide etiquetado fabricado medido de acuerdo con el área de curva por FLD $IFN\alpha\text{-fluoresceína} = f(\text{área por UV})$ de homopolímeros IFNα etiquetados estándar.

25 Contribución de UV KLH etiquetado en el quinoide etiquetado fabricado medido de acuerdo con el área de la curva por FLD $KLH\text{-Atto565} = f(\text{área por UV})$ de homopolímeros KLH etiquetados estándar.

Se verifica como área UV para que sea una función lineal de la concentración de proteína, este método permite evaluar el porcentaje en peso de IFNα etiquetado en el quinoide etiquetado fabricado total.

30 e) Análisis de lotes

3 lotes de quinoide etiquetados se fabrican y analizan mediante este método.

35 Con base en la proporcionalidad de la señal UV y la concentración y de la señal FLD y UV, la relación entre la cantidad de IFNα y KLH ($mIFN\alpha/mKLH$) se calcula para los tres lotes (Tabla 8).

Tabla 8: Relación de peso de IFNα/KLH en los tres quinoide etiquetados fabricados

	Relación $mIFN\alpha/mKLH$	Media	% RSD
Lote 1	0.29	0.28	12
Lote 2	0.31		
Lote 3	0.25		

40 Se encuentra una relación media $mIFN\alpha/mKLH$ de 0,28 con una desviación estándar relativa <15%.

Ejemplo 11: Títulos de anticuerpos Anti- $mIFN\alpha$ producidos al neutralizar capacidades cuando se inyecta producto inmunogénico de la invención como una emulsión con Swe o Swe-a

Fabricación $mIFN\alpha$ -K:

45

En resumen, se mezcla IFNαA de murino (PBL Biomedical Laboratories) y KLH natural (Sigma) en una relación de 50:1 y se trata con 22.5 mM de glutaraldehído durante 45 minutos. Después de diálisis contra solución salina regulada por fosfato (PBS) para eliminar el exceso de glutaraldehído, la solución se incubó con 66 mM de formaldehído por 48 horas

ES 2 644 824 T3

a 37 °C. Después de apagar con glicina (0.1 M final) y posterior diálisis contra PBS utilizando una membrana de corte de 10 kDa, la preparación se filtra utilizando una membrana de 0.22 µm y se almacena a 4°C.

Protocolo de inmunización:

5

Se inmunizan ratones i.m. dos veces en el día 0 y día 21 con mIFN-k (10 µg por inyección) como una emulsión 1 a 1 con SE o adyuvante SE-a (100 µl de volumen final).

Determinación de títulos de anticuerpos anti-mulFNα y anti-KLH mediante ELISA

10

Se analiza el suero para detectar anticuerpos contra mulFNα o KLH mediante ELISA. En resumen, se recubren placas Maxisorp de 96 pozos (Nunc) fueron recubiertas con 100 ng/pozo de mulFNαA (PBL Biomedical Laboratories) para detectar anticuerpos anti-mulFNα o KLH natural (Sigma) para detectar los anticuerpos anti-KLH.

15

Se agrega a los pozos una dilución de muestras en serie de suero dobles (desde 1:100 hasta 1:51,200). Los pozos blancos reciben 100 µL de regulador de dilución. Después de 1.5 horas a 37°C, se detectan los anticuerpos con 100 µL de peroxidasa de rábano conjugada con inmunoglobulina G anti-ratón (IgG) y O-fenilendiamina, un sustrato colorimétrico para peroxidasa de rábano. Se utilizó un grupo de suero de ratones Balb/c inmunizado mulFN-K como control positivo. Se registró la densidad óptica (OD) en una longitud de onda de 490 nm. Se realizaron ensayos ELISA por duplicado. En cada placa, se reservaron dos pozos para blancos; su valor promedio se resta de todos los pozos.

20

Se calculan los títulos de anticuerpo al interpolar el OD máximo (OD_{max})/2 sobre el eje x. La ecuación usada fue $y = ax + b$ para una línea recta que pasa a través de dos puntos que rodean el OD_{max}/2.

25

Determinación de neutralización de la capacidad de anticuerpos anti-mulFNα inducidos después de inmunizaciones IFN-K

Se determina la capacidad de neutralización utilizando el ensayo citopático antivírico clásico (EMCV/ L929). En este ensayo, el título de actividad antivírica de mulFNα se determina con respecto a su capacidad para inhibir el efecto letal del virus de la Encefalomiocarditis (EMCV) en células L-929 de murino (ATCC).

30

En resumen, se agregan 25 µL de muestras de suero diluido (o anticuerpo de control) a las placas de cultivo de 96 pozos (Nunc) en diluciones seriales dobles (desde 1: 200 hasta 1:6400). Se utiliza un anticuerpo policlonal de conejo comercial anti-mulFNα (de PBL, ref: 32100-1) como un control positivo. Después de incubación con 25 IU/pozo de mulFNα durante 1 hora a temperatura ambiente, se cultivan células L-929 20x10³ por pozo y se incuban a 37°C. Después de crecimiento en la noche, las placas se lavan con PBS y se agregó a cada pozo 100 µl/pozo de solución EMCV (100 veces la dosis necesaria para matar el 50% de las células). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Finalmente, se agregó 20 µL por pozo de MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, metosulfato de fenazina/sal interna) solución (Promega) y las placas se incuban durante 4 h a 37°C y 5% CO₂ en un incubador humidificado (protegido de la luz). Luego, se mide el OD en 490 nm para cada pozo. El OD del blanco (pozos con 100 µl de medio de cultivo solo) se resta de la muestra OD.

35

40

Se calcula la capacidad de neutralización de cada muestra como sigue:

45

Capacidad de neutralización (%) = $100 \times [(prueba\ OD - virus\ OD)/(células\ OD)]$ en el que

prueba OD es el OD para la muestra de prueba (células + IFNα + suero + virus)

OD de virus es el OD para el control del virus (células + virus)

50

células OD es el OD para 20,000 células/pozo (células + IFNα + virus).

Se grafican las capacidades de neutralización como una función de la dilución de suero. El título (número de dilución de suero) neutraliza 50% de los valores de actividad IFNα determinado mediante interpolación en la parte lineal de la curva.

55

Los resultados mostraron que los títulos anti-mulFN α y los títulos anti-KLH estuvieron presentes en suero de ratón recolectado en el día 31 después de primera inyección de mulFN-K emulsificado en SWE o SWE-a; y que los anticuerpos anti-mulFN α tuvieron capacidades de neutralización (NC50 > 200).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a hemocianina de lapa californiana (KLH) para uso en el tratamiento de una afección relacionada con IFN α en un sujeto humano en necesidad del mismo, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico que se va a administrar al sujeto es por lo menos 60 μ g de producto inmunogénico por administración, en el que la relación IFN α /KLH en peso varía desde 0.06 hasta 0.6, y en el que la afección relacionada con IFN α se selecciona del grupo que comprende lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, escleroderma, síndrome de Sjögren, vasculitis, VIH, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmunitaria y miositis.
- 10 2. El producto inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico previene la ocurrencia de síntomas de una enfermedad unida a una sobreproducción de IFN α .
- 15 3. El producto inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico previene el empeoramiento de una enfermedad unida a una sobreproducción de IFN α .
- 20 4. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva del producto inmunogénico que se va a administrar al sujeto es desde 60 μ g a 1000 μ g de producto inmunogénico por administración.
5. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto inmunogénico se administra al sujeto por lo menos dos veces en un mes.
- 25 6. El producto inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el producto inmunogénico se administra adicionalmente al sujeto por lo menos una vez cada tres meses.
- 30 7. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto inmunogénico se administra adicionalmente al sujeto cuando, en una muestra de suero obtenida del sujeto, la cantidad de anticuerpos anti- IFN α es indetectable.
- 35 8. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el producto inmunogénico se inactiva fuertemente, lo que significa que el producto muestra menos de 5% de actividad antivírica en las condiciones de PRUEBA B.
9. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el producto inmunogénico es capaz de neutralizar la actividad antivírica de IFN α en las condiciones de PRUEBA C.
- 40 10. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende por lo menos un subtipo de IFN α .
11. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el subtipo de IFN α es IFN α 2b.
- 45 12. El producto inmunogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el producto inmunogénico es una vacuna, preferiblemente en la forma de una emulsión.
- 50 13. Una forma de dosificación unitaria que comprende por lo menos 60 μ g de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a KLH de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Un dispositivo médico que comprende por lo menos 60 μ g de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a KLH de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 55 15. Un kit que comprende por lo menos un frasco que contiene por lo menos 60 μ g de un producto inmunogénico que comprende IFN α acoplado a KLH de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, por lo menos un frasco que contiene adyuvante, y medios para poner en contacto dicho producto inmunogénico con el adyuvante, y para emulsificar la mezcla con el adyuvante.

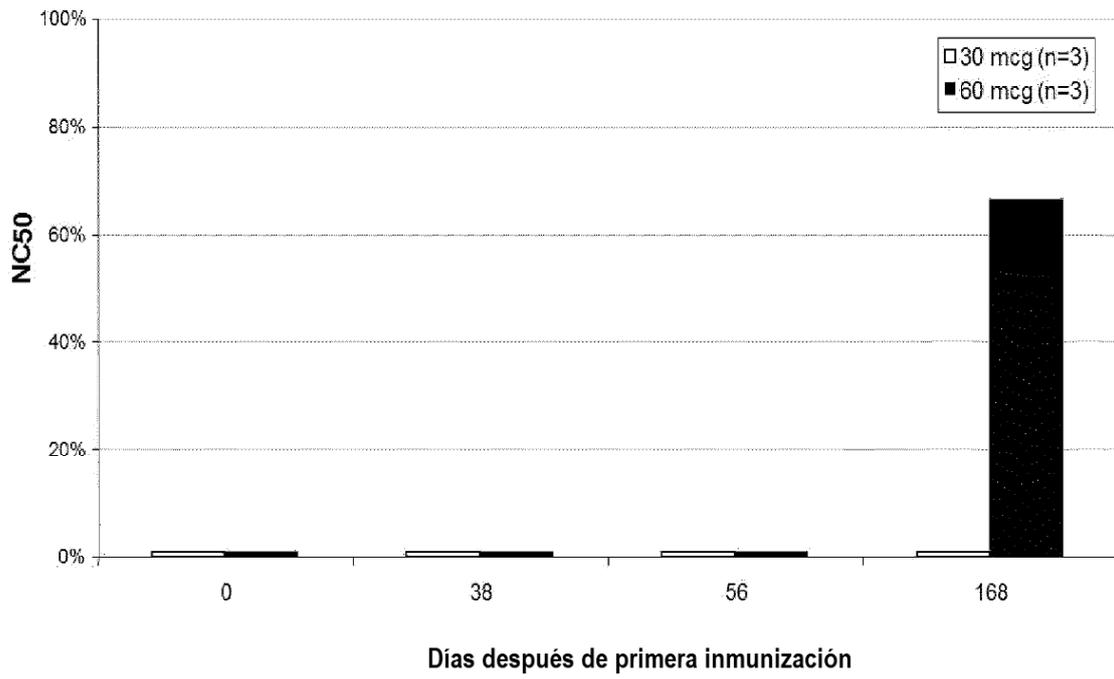


FIG. 1

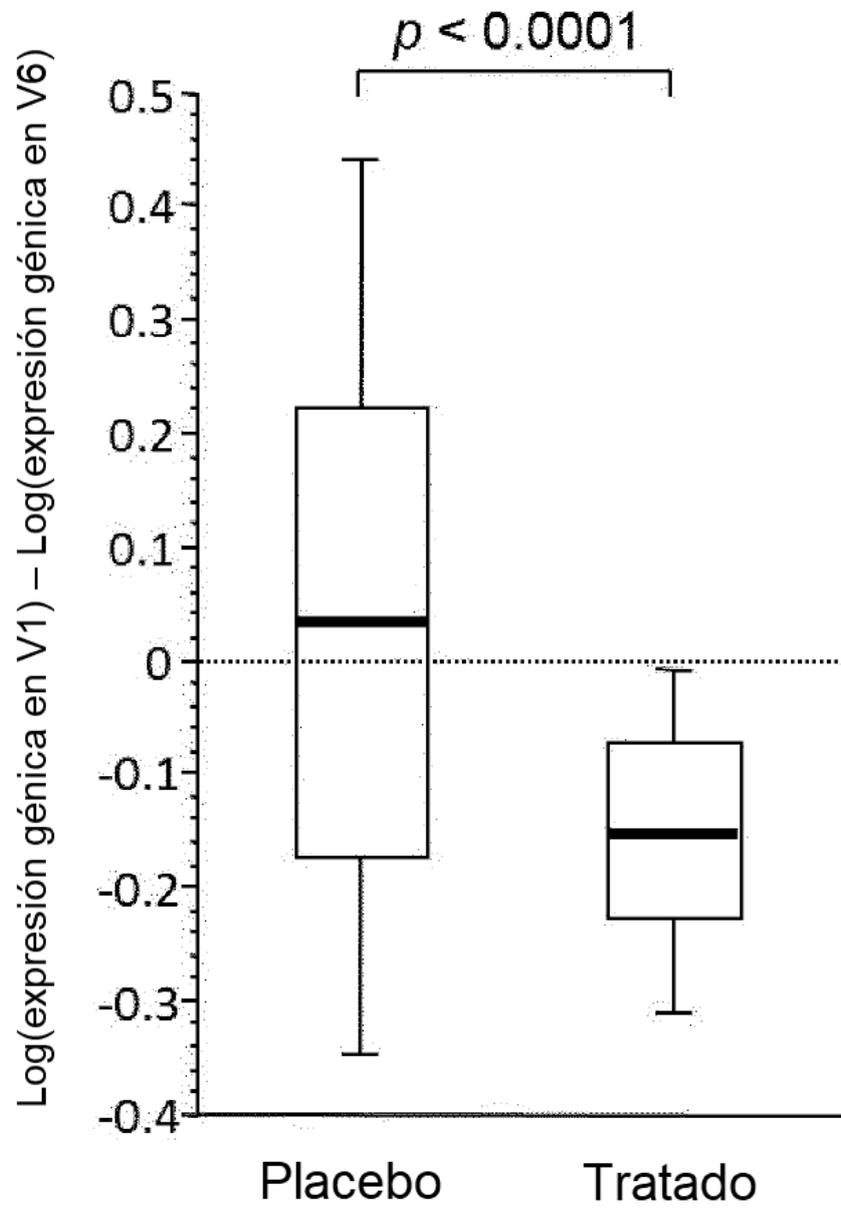


FIG. 2

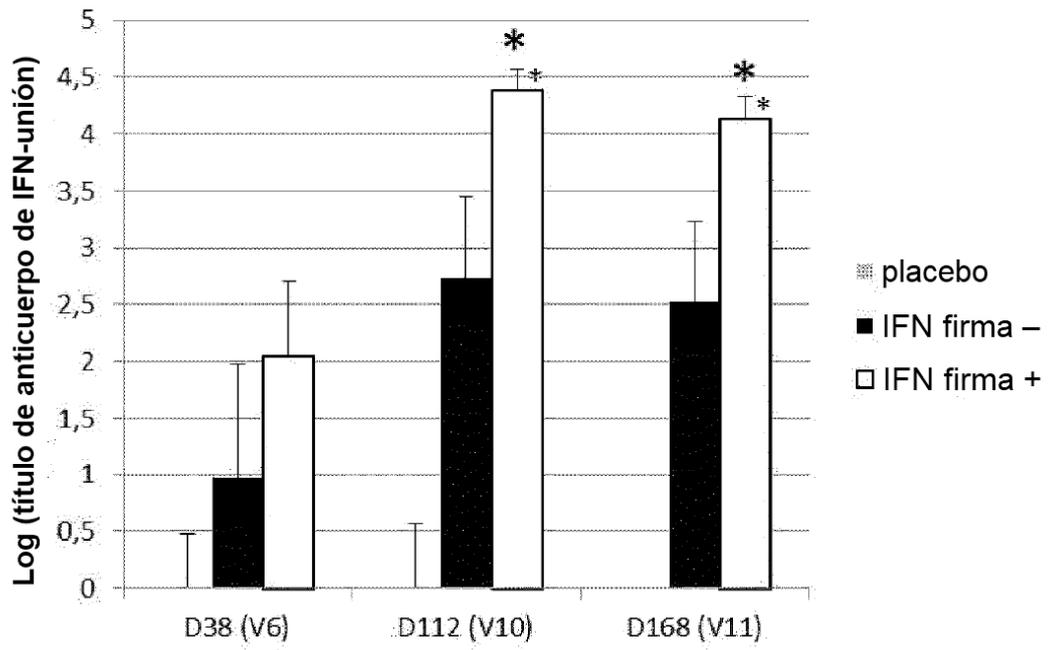


FIG. 3

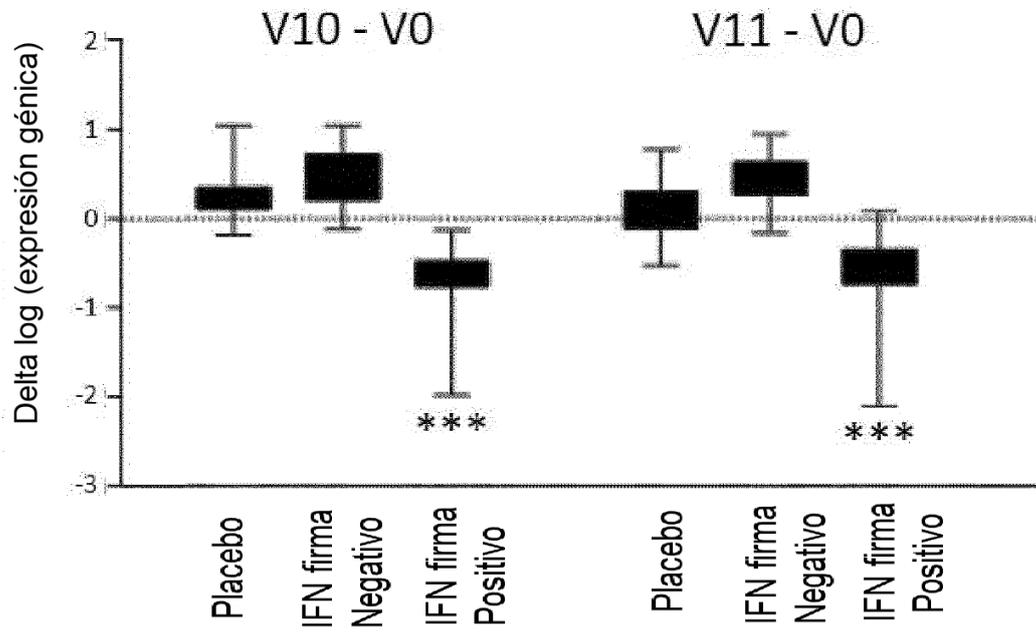


FIG. 4

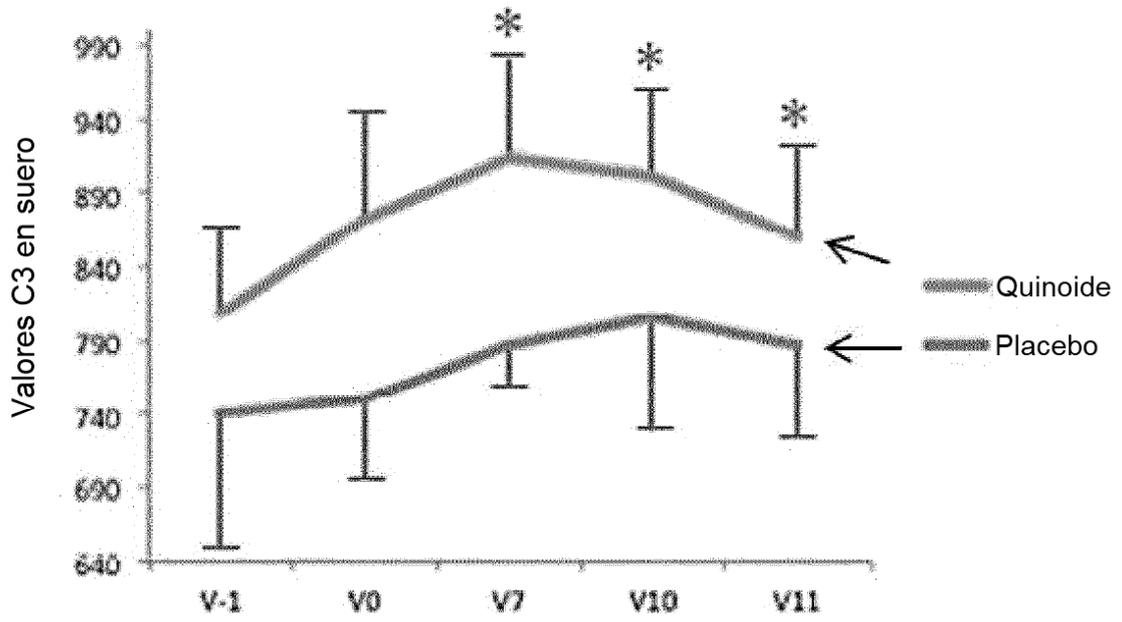


FIG. 5