

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 384 278**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07734572 .6**

(96) Fecha de presentación: **15.05.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2021033**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2009**

(54) Título: **IL-1-alfa para su uso en un procedimiento de tratamiento de placas ateroscleróticas**

(30) Prioridad:

**15.05.2006 US 800029 P**

(73) Titular/es:

**XBiotech, Inc**

**1055 West Hastings Street, Suite 300  
Vancouver, British Columbia V6E 2E9, CA**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.07.2012**

(72) Inventor/es:

**SIMARD, John**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.07.2012**

(74) Agente/Representante:

**Carpintero López, Mario**

**ES 2 384 278 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

IL-1 $\alpha$  para su uso en un procedimiento de tratamiento de placas ateroscleróticas.

### Antecedentes de la invención

La IL-1 $\alpha$  se caracteriza bien como un mediador principal de la inflamación y su función en enfermedades inflamatorias relacionadas se ha sugerido en diversos modelos animales. Se han detectado auto-anticuerpos (aAb) de IgG humana contra la interleucina (IL)-1 $\alpha$  con una frecuencia relativamente alta en la población general. De hecho, se ha publicado que más de un 20 % de personas aparentemente sanas tienen aAb altamente específicos contra la IL-1 $\alpha$ . Aunque observaciones de hombres con aAb naturales contra IL-1 $\alpha$  han sugerido una función para la neutralización de la IL-1 $\alpha$  endógena en riesgo reducido de desarrollo de enfermedades inflamatorias relacionadas, tales como aterosclerosis o artritis reumatoide, estos estudios no han descartado la presencia de otros auto-anticuerpos en estos individuos y ha sido difícil establecer un vínculo causal y no se ha establecido claramente ninguna función fisiológica de estos anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$ .

El documento WO2004/100987 desvela el uso de un antagonista de IL-1 en el tratamiento de hiperplasia neoíntima.

Merhi-Soussi y col., (Cardiovasc. Res., 66, 583-593, 2005) desvelan que la IL-1 desempeña una función en aterosclerosis en ratones macho con el gen de apolipoproteína E inactivado (*knockout*).

Svenson y col., (J. Immunol. Methods, 236, 1-8, 2000) desvelan que la IL-1 $\alpha$  puede usarse para inmunizar y generar auto-anticuerpos neutralizantes contra IL-1 $\alpha$ .

Massimo y col. (Immunity and Ageing, 3, 4, 2006) desvelan que la IL-1 $\alpha$  es un marcador de senescencia celular endotelial.

Los documentos WO2007/015128 y WO2007/039552 pueden citarse solo bajo el Artículo 54(3) del CPE y se refieren al el uso de auto-anticuerpos contra IL-1 $\alpha$  para el tratamiento de la aterosclerosis y el uso de IL-1 para el tratamiento de diversas enfermedades, respectivamente.

### Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Formación de auto-anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$  el día 56 en ratones C57BL/6 después de tres inyecciones subcutáneas con conjugado de IL-1 $\alpha$ -DPP en alumbre (◆). Ratones de control inmunizados solo con DPP en alumbre (■).

FIG. 2. Destrucción mediada por complemento dependiente de anticuerpos de células EL-4. Las células EL-4 se incubaron con diluciones en serie de antisuero policonal de ratón anti-IL- $\alpha$  de ratón. La proporción de células destruidas frente a células viables es proporcional a la concentración de suero. Como control positivo se usó un anticuerpo monoclonal humano anti-IL-1 $\alpha$  de ratón. La incubación con suero murino sin tratar o sólo medio cultivo sirvió como dos controles negativos.

### Descripción detallada de la invención

Los ratones ApoE-/ tienen un defecto en el transporte de lípidos modificado por ingeniería genética que da como resultado una evolución rápida de placas similares a aterosclerosis en arterias principales. Se considera que estos ratones son el modelo más convincente para la aterosclerosis humana, porque son hipercolesterolemicos y desarrollan espontáneamente lesiones arteriales. En consecuencia, los ratones ApoE-/ se han usado mucho como un sistema de modelo para el estudio de la aterosclerosis y tratamientos.

Inmunizando ratones ApoE-/ contra IL-1 $\alpha$  puede obtenerse, por ejemplo, un modelo animal para la neutralización de anticuerpos de IL-1 $\alpha$ . Todos los animales inmunizados desarrollan aAb de IgG contra IL-1 $\alpha$ , que persiste a altos niveles. El aAb contra IL-1 $\alpha$  de suero de ratones inmunizados inhibe la unión de IL-1 $\alpha$  a NOB-1, una línea de linfocitos T murina sensible a IL-1 $\alpha$ , y neutraliza la IL-1 $\alpha$  (pero no la IL-6 inducida por IL-1 $\beta$ ) *in vivo*.

Los ratones de control ApoE-/ que se alimentan con una dieta alta en grasas desarrollan lesiones similares a la aterosclerosis en las arterias principales. Las lesiones están marcadas por infiltración de macrófagos, un núcleo necrótico y células de la musculatura lisa proliferantes con diversas cantidades de matriz extracelular. Por el contrario, los animales ApoE-/ inmunizados contra IL-1 $\alpha$  tienen niveles de lesiones ateroscleróticas drásticamente reducidos y una notable resistencia al avance de la aterosclerosis. En ratones que, antes de la inmunización, tienen estrías adiposas (el comienzo de la lesiones ateroscleróticas) la inmunización con IL-1 $\alpha$  detiene el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas de manera que el lecho vascular permanece esencialmente sano.

Los ratones ApoE-/ están bien protegidos contra trastornos relacionados con la aterosclerosis (por ejemplo, cardiopatía isquémica periférica, arteropatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, arteropatía periférica) por la presencia de auto-anticuerpos contra IL-1 $\alpha$  endógenos generados mediante inmunización. El modelo animal apoya

las observaciones clínicas anteriores de los autores de la invención de que el hombre con aAb naturales contra IL-1 $\alpha$  tiene una frecuencia reducida de cardiopatías relacionadas con la aterosclerosis en comparación con el hombre que no tiene aAb neutralizantes contra IL-1 $\alpha$ .

Debido a que se ha encontrado que los seres humanos, que producen aAb contra IL-1 $\alpha$ d manera natural, tienen menor riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, parece probable que los aAb naturales contra IL-1 $\alpha$  desempeñen una función fisiológica neutralizando los efectos inflamatorios perjudiciales de IL-1 $\alpha$  en el endotelio vascular. Por tanto, la invención también proporciona un procedimiento para el tratamiento de placas ateroscleróticas en un mamífero induciendo auto-anticuerpos contra IL-1 $\alpha$  protectores contra la enfermedad. Observaciones clínicas de auto-anticuerpos contra IL-1 $\alpha$  aproximadamente en el 20 % de la población, sin trastornos de salud evidentes, sugieren que la administración de autoanticuerpos neutralizantes contra IL-1 $\alpha$  no supondría un riesgo para la salud. Además, ratones con el gen de IL-1 $\alpha$  inactivado que también son aparentemente sanos, apoyan esta estrategia como inocua. La inducción de aAb contra IL-1 $\alpha$  en seres humanos es por lo tanto una manera inocua y eficaz para reducir el riesgo y la gravedad de enfermedades relacionadas con la aterosclerosis.

Cualquiera de los procedimientos de inmunización conocidos en la técnica puede usarse para conseguir la respuesta de auto-anticuerpos deseada en cualquier modelo animal o paciente mamífero (por ejemplo, gatos, perros, ovejas, cerdos, cabras; preferentemente seres humanos) (véase a más adelante).

ADYUVANTE	EJEMPLO
Sal inorgánica	Hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, hidróxido de berilio
Sistemas de aplicación	Adyuvante incompleto de Freund
Productos bacterianos	Adyuvante completo de Freund, BCG, plásmidos
ADN	Motivos CpG
Complejos inmunoestimuladores (ISCOMS)	Mezcla de Quil A que contiene proteínas virales
Citocinas	GM-CSF, IL-12, IL-1, IL-2
Virus recombinantes	Gripe
Conjugado de partículas similares a virus ( <i>Particle Like Virus, VLP</i> )	VLP 2/6 que contienen VP2 de rotavirus bovino y VP6 de rotavirus humano
Bacterias recombinantes	<i>Salmonella typhimurium</i> atenuada

La descripción anterior describe en líneas generales la presente invención. Un entendimiento más completo puede obtenerse en relación con los siguientes ejemplos específicos, que solo se proporcionan con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

## 20 Ejemplo 1

### Ratones con el gen ApoE inactivado (Knockout)

Se obtuvieron ratones ApoE-/ de Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Sólo se usaron animales macho para evitar posibles influencias de género sobre el desarrollo de lesiones vasculares; además, se han realizado estudios clínicos para observar una función protectora para aAb contra IL-1 $\alpha$  en el avance de la aterosclerosis, hasta el momento, sólo en hombres. Se usaron ratones de diez semanas de vida y se alimentaron con una dieta de alto contenido de colesterol (colesterol al 1,25 %, colato al 0 %; Research Diets, New Brunswick, NJ). Los ratones se alimentaron con la dieta durante 10 semanas y después se sacrificaron. Se tomaron muestras de sangre y se perfundieron las aortas, se seccionaron en trozos y se fijaron o se congelaron de acuerdo con procedimientos convencionales.

## 30 Ejemplo 2

### Inmunización con IL-1 $\alpha$ murina

Los ratones se inmunizaron con IL-1 $\alpha$  murina conjugada con derivado proteico purificado (DPP) de tuberculina a una proporción de 0,41 (p/p) de acuerdo con el procedimiento descrito por Svenson y col., J Immunol Methods. 6 de marzo del 2000; 2361(1-2): 1-8. Se inoculó a los ratones inyecciones subcutáneas en la base de la cola. Las inoculaciones se repitieron tres veces, con tres semanas de diferencia. Para analizar los aAb contra IL-1 $\alpha$ , 2 semanas después de cada inyección se extrajo sangre a los ratones del plexo retro-orbital. Los animales de control recibieron el mismo programa de inocular con una solución de DPP que no contenía IL-1 $\alpha$ .

**Ejemplo 3***Ensayos*

Las respuestas de IgG de ratón contra IL-1 $\alpha$  se determinaron como describen Svenson y col., 2000. El análisis de unión de saturación de IL-1 $\alpha$  a IgG se realizó como se describe (Svenson y col., J Clin Invest. Nov 1993; 92(5):

5 2533-9). Idénticas muestras se procesaron en paralelo sobre las columnas de Sepharose de proteína G y columnas que contenían superfine Sephadex G-75 (Svenson y col., Cytokine. Mar 1992; 4(2):1 25-33) para comparar la unión de  $^{125}\text{I}$ -IL-1 $\alpha$  a la IgG en suero con la unión total a suero.

Se realizaron ensayos de receptores celulares usando la línea de linfocitos T murina NOB-1 como se describe en Svenson y col., 2000. También se realizaron ensayos RIA para IL-1 $\alpha$  y ensayos ELISA para IL-6 como se describe en Svenson y col., 2000.

10 Se realizó inducción *in vivo* de IL-6 como se describe en Svenson y col., 2000.

**Ejemplo 4***Ausencia de aAb naturales anti IL-1 $\alpha$  en ratones ApoE-/-*

15 Todos los sueros de 15 ratones ApoE-/- de 10 semanas a 10 meses de vida fueron negativos para aAb de IgG anti-IL-1 $\alpha$ .

**Ejemplo 5***Generación de aAb contra IL-1 $\alpha$  en ratones ApoE-/-*

Después de cuatro inoculaciones con IL-1 $\alpha$  conjugada con DPP, todos los ratones tenían altas titulaciones de aAb de IgG contra IL-1 $\alpha$ . En el suero de ratones de control inoculados sólo con DPP no se encontraron aAb. No hubo diferencia significativa de peso entre los grupos a los 3 meses después de la vacunación.

**Ejemplo 6***Caracterización de aAb inducidos contra IL-1 $\alpha$* 

Se sometió a ensayo suero de los ratones positivos recogido 2 y 6 semanas después de la vacunación. No se observó diferencia entre la unión de IL-1 $\alpha$  total a suero y la unión a IgG. Los valores K<sub>d</sub> oscilaban de 0,1 nM a 1,3 nM (por ejemplo, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 nM).

**Ejemplo 7***Características de los aAb inducidos contra IL-1 $\alpha$* 

Los aAb contra IL-1 $\alpha$  se sometieron a ensayo usando un RIA. Los antisueros actúan de manera similar a los descritos en Svenson y col. 2000.

**Ejemplo 8***Supresión de la unión al receptor*

Todos los sueros aAb positivos recogidos dos semanas después de la vacunación suprimieron la unión de  $^{125}\text{I}$ -IL-1 $\alpha$  a la línea celular murina NOB-1 al menos en un 10 % (por ejemplo, al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o el 95 %) y se sometieron a ensayo como se describe en Svenson y col., 2000. Los controles aAb negativos fueron negativos.

**Ejemplo 9***Neutralización de IL-1 $\alpha$  in vivo*

La actividad neutralizante de los antisueros representativos se sometió a ensayo como se describe en Svenson y col., 2000. Los datos indican que los aAb contra IL-1 $\alpha$  neutralizan la actividad de IL-1 $\alpha$  en células NOB-1.

**Ejemplo 10***Análisis de lesiones ateroscleróticas*

Los ratones se sacrificaron en diferentes momentos y se evaluó el grado de aterosclerosis. La deposición de placas y las lesiones ateroscleróticas se evaluaron en las raíces aórticas y en las aortas toracoabdominales y se cuantificó de acuerdo con procedimientos convencionales (por ejemplo, Trogan y col., Proc Natl Acad Sci USA. 19 de febrero

del 2002; 99(4): 2234-9; Chaabane y col., Invest Radiol. agosto del 2003; 38(8): 532-8). Las áreas de lesión arterosclerótica de las raíces aórticas en los ratones ApoE -/- inmunizados con IL-1 $\alpha$  disminuyeron significativamente en comparación con las de los ratones de control ApoE -/- (por ejemplo, al menos un 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %). El desarrollo de lesiones ateroscleróticas también se examinó en 5 preparaciones de la aorta descendente teñidas con Sudan IV. La formación de lesiones ricas en lípidos sudanófilos en las aortas abdominales de ratones ApoE -/- inmunizados con IL-1 $\alpha$  disminuyó significativamente en comparación con sus grupos de control de la misma camada (por ejemplo, al menos un 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %). De manera similar, la formación de lesiones ateroscleróticas en secciones del arco 10 aórtico, que aparecen tras tinción con hematoxilina-eosina, se reducen significativamente en animales inmunizados con IL-1 $\alpha$  en comparación con los controles (por ejemplo, al menos un 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %).

El área luminal de las arterias coronarias disminuyó significativamente en ratones de control ApoE -/- (por ejemplo, al 15 menos un 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %) en comparación con ratones de control. Los análisis histológicos de las raíces aórticas demostraron la presencia de células positivas para CD68 en la neoíntima en controles ApoE -/- pero no en animales inmunizados con IL-1 $\alpha$ .

### Ejemplo 11

#### Materiales y métodos

##### Medición por ELISA de titulaciones de anticuerpos anti IL-1 $\alpha$

Durante una noche se incubó IL-1 $\alpha$  humana o murina, respectivamente, en placas ELISA de 96 pocillos, usando 0,5 20  $\mu$ g/ml con un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo. Después las placas se lavaron 4 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) + Tween 20 al 0,05 %, a continuación se saturaron con una solución de bloqueo que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en PBS + Tween 20 al 0,05 %. Se usaron 200  $\mu$ l de este tampón de bloqueo 25 por pocillo durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron de nuevo 4 veces con PBS + Tween 20 (PBST) al 0,05 %. Después se añadieron 100 ml de muestras de suero diluidas en serie (diluciones 1:2 en PBST + BSA al 1 %) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente o a 4 °C durante una noche. Después, 30 las placas se lavaron de nuevo 4 veces con PBST. Después, como anticuerpo secundario, se añadió anticuerpo anti-Fc acoplado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (diluido a 1:2000 en PBST con BSA al 1 % en 100  $\mu$ l por pocillo, 1 hora, temperatura ambiente). Ser humano: 0,2  $\mu$ l de anti-IgG humana de cabra-HRP en PBST 400  $\mu$ l + BSA al 1 %. Ratón: 0,5  $\mu$ l de anti-IgG de ratón de cabra conjugada con HRP (H+L). Después las placas se lavaron 35 de nuevo 4 veces con PBST. La reacción de coloración se realizó con tampón ABTS. Tampón ABTS (ácido 3-estibenzotiazolina-6-sulfónico, Sigma, Cat. N° A-1888, 150 mg, ácido cítrico 0,1 M, anhidro Fisher, Cat. N° A-940 en 500 ml; el pH se ajustó a 4,35 con gránulos de NaOH y se conservaron alícuotas de 11 ml a -20 °C, SDS al 40 % (SDS 80 g en 200 ml dd H<sub>2</sub>O), con la adición de 200 ml de DMF (N,N-dimetil formamida)). A cada pocillo se añadieron cien  $\mu$ l de tampón ABTS. Cuando es visible un buen contraste, la reacción se detiene añadiendo 100  $\mu$ l de 40 solución de ácido oxálico al 2 %. La densidad óptica se midió después con un lector ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

#### Ratones

Los ratones ApoE -/- se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, cepa B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc</sup>/J). Los 40 ratones homocigotos para la mutación Apoe<sup>tm1Unc</sup> mostraron un notable aumento en los niveles de colesterol total en plasma que no estaban influenciados por la edad o el sexo. A los 3 meses de vida se encontraron estrías adiposas en la aorta proximal. Las lesiones aumentaron con la edad y progresaron a lesiones con menos lípidos pero con más 45 células alargadas, típicas de un estadio más avanzado de lesión pre-aterosclerótica. Niveles de triglicéridos moderadamente aumentados se habían publicado en ratones con esta mutación sobre un fondo genético C57BL/6 x 129 mixto. Ratones deficientes en ApoE de edad avanzada (>17 meses) habían demostrado desarrollar lesiones xantomatosas en el cerebro que consistían mayormente en hendiduras de colesterol cristalino, glóbulos lipídicos y 50 células vacuoladas. Los xantomas más pequeños se observaron en el plexo coroideo y en el fondo ventral. Recientes estudios indican que ratones deficientes en ApoE tienen respuestas alteradas al estrés, aprendizaje espacial y memoria afectados, potenciación y lesión sináptica a largo plazo alterada. Los ratones C57BL/6 y con SCID se obtuvieron de Harlan (Horst, Países Bajos).

#### 50 Inmunización de ratones con IL-1 $\alpha$ e IL-1 $\beta$ conjugada con DPP

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  se obtuvieron de eBioscience (San Diego, CA). El DPP se obtuvo de Statens Serum Institute (Copenhague, Dinamarca). El procedimiento para la conjugación se adaptó de Svenson y col. (Svenson M. 2000). La IL-1 $\alpha$  o la IL-1 $\beta$  se incubaron durante 48 h a 4 °C con DPP a una proporción de 0,41 (p/p) y en presencia de 55 glutaraldehído al 0,1 % (IL-1/DPP = 0,41). Como un control, el DPP se trató en paralelo pero sin IL-1 $\alpha$  ni IL-1 $\beta$ . Después, el conjugado se absorbió a Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydragel; Reheis Chemical, Dublín, Irlanda) de manera que en el volumen final hubo un 1,5 % de Al(OH)<sub>3</sub>.

La incubación con Alúmina fue durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después las partículas se lavaron con NaCl al 0,9 % y se resuspendieron en NaCl al 0,9 % a una suspensión de 11 µg de IL-1 $\alpha$ /100 µl, suponiendo una adsorción del 70 % para IL-1 $\alpha$  con respecto a Al(OH)<sub>3</sub> (encontrada en estudios piloto usando <sup>125</sup>I-IL-1 $\alpha$ ). El conjugado de IL-1 $\beta$  se preparó de la misma manera. Las suspensiones de control se diluyeron de manera idéntica para ajustar la cantidad de DPP en el conjugado de IL-1 $\alpha$ -DPP. Los conjugados se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

#### **Ejemplo 12**

##### *Generación de una respuesta de anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$ en ratones C57BL/6*

Dado que el sistema inmunitario es tolerante frente a autoproteínas, tales como citocinas, la vacunación activa tiene que destruir la autotolerancia. En caso de la mayoría de las autoproteínas, la inmunotolerancia está producida por una ausencia de linfocitos T específicos como una consecuencia de selección negativa en el timo. En cambio, linfocitos B potencialmente auto-reactivos están normalmente presentes. Cuando se inyecta la autoproteína como IL-1 $\alpha$  en solitario, éstos linfocitos B no responden, debido a la ausencia de linfocitos T auxiliares. El acoplamiento de una proteína extraña, tal como el DPP, al autoantígeno IL-1 $\alpha$ , proporciona linfocitos T auxiliares para la estimulación de linfocitos B, porque los linfocitos T reconocen el DPP que da como resultado una producción de anticuerpos de linfocitos B estimulados contra IL-1 $\alpha$  y DPP.

Por lo tanto, para garantizar la eficacia de los linfocitos T auxiliares para los linfocitos B específicos de IL-1 $\alpha$ , se vacunaron ratones con un conjugado de IL-1 $\alpha$ -DPP en alumbre. Las titulaciones de anticuerpo se determinaron por ELISA. Grupos de 5 ratones recibieron inmunizaciones subcutáneas con 15 µg de IL-1 $\alpha$  recombinante conjugada con 10 µg de DPP usando una etapa de incubación con glutaraldehído. Después, la alumbre absorbió el conjugado de IL-1 $\alpha$ -DPP. Los ratones recibieron tres inmunizaciones subcutáneas de este tipo con un intervalo de tiempo de 2 semanas. Esta inmunización generó altas titulaciones de anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$ , mientras que los ratones de control inmunizados con DPP en alumbre no indujeron titulaciones de anticuerpos detectables (FIG. 1). La inducción de anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$  requirió al menos 2 inyecciones. Después de una sola inyección de conjugado de IL-1 $\alpha$  recombinante-DPP en alumbre no se detectaron respuestas de anticuerpos en suero. Pero después de una tercera inyección de conjugado de IL-1 $\alpha$  recombinante-DPP en alumbre todos los ratones vacunados produjeron anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$ .

#### **Ejemplo 13**

##### *La inmunización activa contra IL-1 $\alpha$ previene la formación de aterosclerosis*

Se inmunizaron activamente ratones *knock out* ApoE (de 6 semanas de vida) con 15 µg de IL-1 $\alpha$  murina conjugada con 10 µg de DPP (derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*) en hidróxido de aluminio los días 0, 14 y 28 por administración subcutánea en la región del cuello. El volumen de la inyección fue de 100 µl y la cantidad de hidróxido de aluminio fue aproximadamente de 1 mg. Los ratones de control se trataron de manera similar pero con una preparación que contenía la misma cantidad de DPP e hidróxido de aluminio pero que no contenía IL-1 $\alpha$ . Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola los días 0, 28, 42 y 56 para medir, por ELISA, la respuesta de anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$ . Cuatro semanas después de la primera inmunización, los ratones comenzaron una dieta aterogénica con pienso granulado que contenía el 16 % de grasa, el 1,16 % de colesterol y el 0,5 % de ácido cárboxílico, una dieta que se sabe que acelera la aterosclerosis. Después, a las 18 semanas de vida, se realizó la eutanasia a los ratones. Su aorta se extirpó para análisis macroscópico y microscópico. Para la histología, los portaobjetos se tiñeron usando Hematoxilina y Eosina (HE), así como Sudan.

Después de este momento, la inspección de la aorta expuesta seccionada usando un microscopio binocular mostró una notable reducción de placas ateroscleróticas en los ratones ApoE-/ inmunizados activamente contra IL-1 $\alpha$ , pero no en los ratones de control ApoE-/ inmunizados sólo contra DPP.

#### **Ejemplo 14**

##### *La inmunización pasiva contra IL-1 $\alpha$ impide la formación de aterosclerosis*

Se inmunizaron activamente ratones C57BL/6 contra IL-1 $\alpha$  con 3 inyecciones subcutáneas de conjugado de IL-1 $\alpha$ -DPP en alumbre. Después de 56 días se recogió su suero y las titulaciones de la generación de auto-anticuerpos anti-IL-1 $\alpha$  se confirmaron mediante ELISA. Se transfirieron pasivamente 200 µl de este suero a ratones *knock out* ApoE de 6 semanas de vida. Estas transferencias pasivas de suero se repitieron cada semana. Ratones de control ApoE-/ recibieron semanalmente transferencias pasivas de suero de ratones C57BL/6 sin tratar. Comenzando con estas transferencias de suero pasivas, los ratones ApoE-/ se alimentaron con una dieta aterogénica con pienso granulado que contenía el 16 % de grasa, el 1,16 % de colesterol y el 0,5 % de ácido cárboxílico para acelerar la formación de aterosclerosis. A los ratones de control ApoE-/ se les transfirió pasivamente 200 ml de suero de ratones C57BL/6 sin tratar a intervalos semanales. Después de 6 semanas se realizó la eutanasia a los ratones para análisis macroscópico e histológico de la aorta. El análisis histológico incluyó tinción con hematoxilina y eosina de

cortes transversales así como tinciones con Sudan.

Después de estas 6 semanas, la inspección de la aorta expuesta seccionada usando un microscopio binocular mostró una notable reducción de placas ateroscleróticas en los ratones ApoE-/ a los que se les había transferido pasivamente antisuero anti-IL-1 $\alpha$ , pero no en los ratones de control ApoE-/ que recibieron suero sin tratar.

## 5 Ejemplo 15

*La inmunización activa frente a IL-1 $\beta$  permaneció sin efecto sobre la aterosclerosis*

Ratones *knock out* ApoE (de 6 semanas de vida) se inmunizaron activamente con 15  $\mu$ g de IL-1 $\beta$  murina conjugada con 10  $\mu$ g de DPP (derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*) en hidróxido de aluminio los días 0, 14 y 28 por administración subcutánea en la región del cuello. El volumen de la inyección fue de 100  $\mu$ l y la cantidad de hidróxido de aluminio fue aproximadamente de 1 mg. Los ratones de control se trataron de manera similar pero con una preparación que contenía la misma cantidad de DPP e hidróxido de aluminio pero que no contenía IL-1 $\beta$ . Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola los días 0, 28, 42 y 56 para medir, por ELISA, la respuesta de anticuerpos anti-IL-1 $\beta$ . Cuatro semanas después de la primera inmunización, los ratones comenzaron una dieta aterogénica con pienso granulado que contenía el 16 % de grasa, el 1,16 % de colesterol y el 0,5 % de ácido cárboxílico, una dieta que se sabe que acelera la aterosclerosis. Después, a las 18 semanas de vida, se realizó la eutanasia a los ratones. Su aorta se extirpó para análisis macroscópico y microscópico. Para la histología, los portaobjetos se tiñeron usando Hematoxilina y Eosina (HE), así como Sudan.

Después de este momento, la inspección de la aorta seccionada expuesta usando un microscopio binocular mostró placas ateroscleróticas que tenían la misma extensión tanto en ratones ApoE-/ inmunizados contra antisuero IL-1 $\beta$  como en los ratones ApoE-/ de control.

## Ejemplo 16

*La inmunización pasiva frente a IL-1 $\beta$  permaneció sin efecto sobre la aterosclerosis*

Se inmunizaron activamente ratones C57BL/6 contra IL-1 $\beta$  con 3 inyecciones subcutáneas de conjugado de IL-1 $\beta$ -DPP en alumbre. Después de 56 días su suero se recogió y la generación de titulaciones de autoanticuerpos anti-IL-1 $\beta$  se confirmó por ELISA. Se transfirieron pasivamente 200  $\mu$ l de este suero a ratones *knock out* ApoE de 6 semanas de vida. Estas transferencias pasivas de suero se repitieron cada semana. Ratones ApoE-/ de control recibieron 200  $\mu$ l de transferencias de suero de ratones C57BL/6 sin tratar. Comenzando estas transferencias de suero pasivas, los ratones ApoE-/ se alimentaron con una dieta aterogénica con pienso granulado que contenía el 16 % de grasa, el 1,16 % de colesterol y el 0,5 % de ácido cárboxílico, para acelerar la formación de aterosclerosis. A los ratones de control ApoE-/ se les transfirió pasivamente 200 ml de suero de ratones C57BL/6 sin tratar a intervalos semanales. Después de 6 semanas se realizó la eutanasia a los ratones para análisis macroscópico e histológico de la aorta. El análisis histológico incluyó tinción con hematoxilina y eosina de cortes transversales, así como tinciones con Sudan.

Después de estas 6 semanas, la inspección de la aorta seccionada expuesta usando un microscopio binocular mostró placas ateroscleróticas que tenían la misma extensión en ambos, ratones ApoE-/ que recibieron antisuero anti-IL-1 $\beta$  o suero de ratones sin tratar.

## Ejemplo 17

*Destrucción mediada por complemento dependiente de anticuerpos-DCDA*

Se inmunizaron activamente ratones C57BL/6 contra IL-1 $\alpha$  con 3 inyecciones subcutáneas de conjugado de IL-1 $\alpha$ -DPP en alumbre. Después de 56 días se recogió su suero y la generación de titulaciones de autoanticuerpos anti-IL-1 $\alpha$  se confirmó por ELISA. Los sueros se inactivaron con calor. En placas de 96 pocillos, se sembraron 50  $\mu$ l de una suspensión de células EL-4. A cada uno de estos pocillos se añadieron 15  $\mu$ l de diluciones en serie 1:2 del suero inactivado con calor. Después, las placas se incubaron durante 20 minutos a 37 °C. Después se añadieron a cada pocillo 25 ml de suero murino. Tras otras 5 h de incubación a 37 °C los pocillos se fotografiaron y después las células se contaron en una cámara de recuento usando azul de tripreno para diferenciar las células vivas de las muertas.

El antisuero policlonal de ratón anti-IL-1 $\alpha$  de ratón medió la destrucción dependiente de complemento de células tumorales EL-4 en una manera dependiente de la concentración. Véase FIG. 2.

**REIVINDICACIONES**

1. Una IL-1 $\alpha$  para su uso en un procedimiento de tratamiento de placas ateroscleróticas reduciendo dichas placas al menos un 10 % en un mamífero induciendo autoanticuerpos contra IL-1 $\alpha$ .
2. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la IL-1 $\alpha$  está unida a una partícula de tipo virus.
3. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2, en el que el mamífero es un ser humano.
4. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2, en el que la IL-1 $\alpha$  es una IL-1 $\alpha$  recombinante.
5. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la IL-1 $\alpha$  recombinante es murina o humana.
6. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la IL-1 $\alpha$  está unida a un vehículo.
- 10 7. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el vehículo es un derivado proteico purificado (DPP) de tuberculina.
8. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2, en el que la IL-1 $\alpha$  se usa en presencia de un adyuvante.
9. IL-1 $\alpha$  para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el adyuvante es hidróxido de aluminio.

ES 2 384 278 T3

FIG. 1

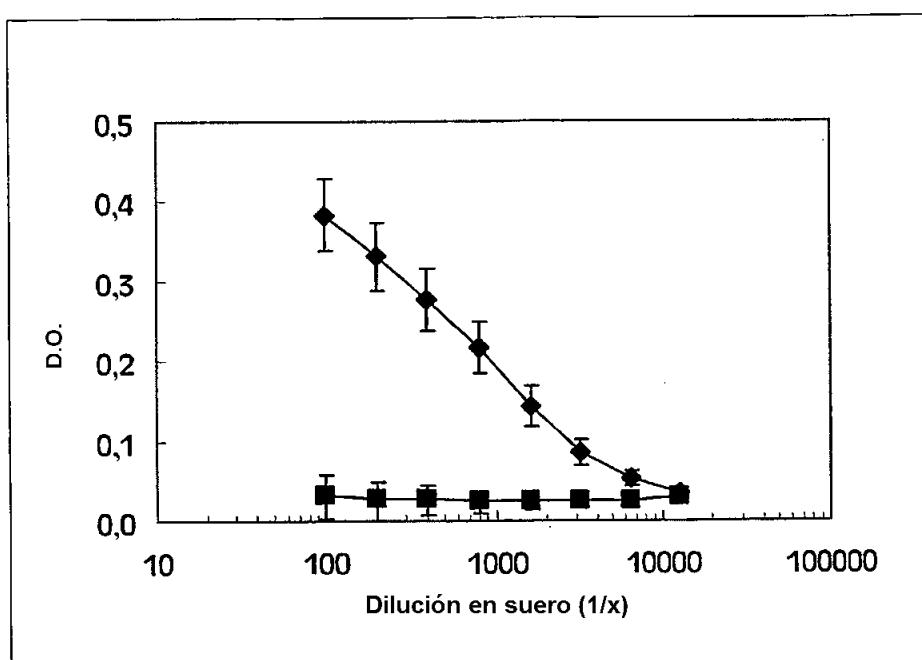


FIG. 2

## DCDA con células EL-4

