

COMPOSICIONES VACUNALES DEPLETANTES DE FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con las ramas de la Biotecnología y la Medicina, particularmente se describen composiciones vacunales cuyo antígeno es un factor de crecimiento hematopoyético que puede ser el factor estimulante de colonias de granulocitos y/o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

10

ARTE PREVIO

La inflamación es un proceso complejo, mediante el cual los leucocitos y las proteínas efectoras derivadas del plasma se reclutan en sitios específicos de los tejidos para impulsar una respuesta inmune local (Newton K, Dixit VM. (2012) Cold Spring Harb Perspect Biol. 4(3): a006049). Si bien es una forma eficaz de limitar las infecciones e iniciar la remodelación tisular, debe controlarse para evitar daños colaterales en los tejidos. Períodos cortos de inflamación aguda permiten contener la infección o lesión y la cicatrización de heridas, pero los períodos prolongados de inflamación crónica (debido a activación de células productoras de citocinas y granulocitos para aumentar su producción, creando un circuito de retroalimentación positiva) pueden causar un aumento del daño tisular localmente y una inmunidad regulada sistémicamente, particularmente las respuestas de las células T.

La inflamación crónica por diversas razones carece de una fase de resolución completa, nunca termina. Existen diferentes motivos para ello, como el contacto prolongado con infecciones o irritantes y la presencia de células que secretan continuamente mediadores inflamatorios. Cuando el estímulo inflamatorio se vuelve permanente, comienza la inmunosupresión y la tolerancia inmunológica. En este caso, niveles subclínicos pero elevados de citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF por sus siglas en inglés (granulocyte colony-stimulating factor) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF por sus siglas en inglés (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) están relacionados con la tolerancia inmunitaria, mientras que los niveles significativamente elevados están relacionados con exacerbaciones inflamatorias (Rogovskii V. (2020) Front Immunol. 11:2061). De hecho, el aumento del nivel basal de citocinas inflamatorias, como el G-CSF y el GM-CSF, puede mediar una mayor tolerancia inmunitaria. El precio de una mayor tolerancia inmunológica es una mayor susceptibilidad a los tumores (Stape T (2018) Asia Pac J Oncol Nurs. 5:40–2)

El G-CSF y el GM-CSF son las principales citocinas en la granulopoyesis y la diferenciación de precursores granulocíticos normales de la médula ósea. Sus efectos fisiológicos están mediados por la unión a receptores específicos de la superficie celular. Se conoce que las concentraciones plasmáticas de G-CSF y GM-CSF y sus receptores

5 se modifican en enfermedades inflamatorias que muestran neutrofilia, fiebre, inflamación, destrucción de tejidos y, en algunos casos, shock y muerte (Watari K y cols. (1989) *Blood*. 73(1):117-22; Hamilton JA (2020) *J Exp Med*. 217(1):e20190945).

Cuando tiene lugar una infección, la liberación de G-CSF y GM-CSF aumentan de forma natural, debido a que algunos componentes del agente infeccioso estimulan su

10 producción. Los neutrófilos originados a partir de la cadena de reacciones producidas, a su vez atacan a los agentes infecciosos, favoreciendo su destrucción. (Eyles JL y cols. (2006) *Nat. Clin. Pract. Rheumatol*. 2(9): 500–510; Ahandideh B y cols. (2020) *Hum Immunol*. 81(5):206-217). El G-CSF y GM-CSF tienen también un papel clave en el inicio, progresión y metástasis del cáncer (Do H y cols. (2020) *Cancers*. 12(2):287). La

15 acción combinada de las citocinas, producidas por las células neoplásicas, modula la respuesta celular del sistema inmunológico del huésped. Los niveles altos de citocinas inflamatorias se han correlacionado con un estadio avanzado y un mal pronóstico para varios tipos de cáncer (Silva EM y cols. (2017) *PLoS ONE* 12(7): e0181125. ; Lippitz, BE (2013). *The Lancet Oncology*, 14(6), e218–e228).

20 Se conoce que los neutrófilos intervienen de manera significativa en diferentes patologías, que se caracterizan por inflamación crónica, como son el desarrollo de los tumores, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la uveítis, la artritis, la espondilitis anquilosante, lupus eritematoso, asma, síndrome de liberación de citocinas, entre otras. De hecho el índice neutrófilos/linfocitos es un indicador de pronóstico en varias de ellas

25 (Lee HN y cols. (2019) *Rheumatol Int*. 39(5):859-868).

En la clínica, el G-CSF y el GM-CSF se han utilizado ampliamente para tratar la neutropenia asociada con la quimioterapia y para movilizar células madres hematopoyéticas para el trasplante (Roberts, AW (2005) *Growth Factors* 23(1): 33-4; Mehta HM y cols. (2015) *J. Immunol*. 195(4):1341-1349), sin embargo, no hemos

30 encontrado precedentes en sentido contrario.

Se han descrito anticuerpos (Acs) monoclonales que pueden jugar un rol diagnosticador o como terapia pasiva para combatir tumores de alta expresión del receptor del G-CSF (G-CSFR). Se ha informado de un Ac monoclonal neutralizante humanizado dirigido contra el G-CSFR que fue bien tolerado en primates y no dio lugar a neutropenia.

35 Además, un Ac monoclonal anti-G-CSFR murino suprimió la artritis e inhibió significativamente la acumulación de neutrófilos en las articulaciones, lo que ocurrió sin neutropenia, lo que sugiere que el bloqueo de G-CSFR afecta la localización de

neutrófilos en los sitios inflamatorios (Campbell IK (2016). J. Immunol. 197: 4392-4402). Sin embargo, para el tratamiento antiproliferativo y antitumoral no se han encontrado evidencias. Dado que el G-CSF es un ligando clave en el control y función de los neutrófilos, la utilización de formulaciones que inhiben la activación de esta citocina como indicaciones terapéuticas en pacientes con este tipo de enfermedad es útil e importante.

Existe un estudio de fase I en voluntarios sanos con un Ac monoclonal anti-G-CSFR para el tratamiento de la hidradenitis supurativa y pustulosis palmoplantar (WO 2019/178645 y WO 2020/113270), donde el número de neutrófilos circulantes no bajan a niveles críticos.

El bloqueo de la vía GM-CSF por Acs monoclonales dirigidos contra la propia citocina o su receptor se describe en WO 2010/124163 y hay ensayos clínicos en curso en pacientes con artritis reumatoide refractaria

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04333147>, Consultado: 23 noviembre, 2020; ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04134728>, Consultado: 23 Nov, 2020) y en pacientes con COVID <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04376684>, Consultado: 23 de noviembre de 2020. También se ha descrito el uso de Acs contra el GM-CSF en el tratamiento de la toxicidad inducida por las inmunoterapias del tipo ACT (WO 2019/070680).

Las concentraciones de citocinas G-CSF y GM-CSF que son detectadas en los pacientes son elevadas por lo que aún altas dosis de anticuerpos son incapaces de neutralizar su actividad por completo. La ruptura de la tolerancia y la generación de inmunogenicidad no son procesos obvios para estas moléculas debido a que se encuentran en el organismo en condiciones normales. Hasta el momento no se ha propuesto ninguna inmunoterapia activa contra tumores dependientes de G-CSF o GM-CSF, que sea capaz de inhibir el crecimiento de los mismos.

Por primera vez, en la presente invención se presenta la respuesta inmunológica depletante de estos factores de crecimiento hematopoyéticos y se muestran evidencias del efecto terapéutico de esta respuesta en modelos experimentales de inflamación y cáncer. Dichas composiciones producen aumento en los títulos de Acs anti-GCSF y anti-GM-CSF, disminución del número de neutrófilos circulantes, efecto antiproliferativo, antiinflamatorio y un elevado efecto antitumoral. Además, se pueden emplear en escenarios crónicos pues al requerir dosis bajas de los principios activos se reduce su toxicidad.

Los efectos mostrados por las composiciones vacunales aquí descritas son sorprendentes e inesperados. El carácter complejo de las redes de citocinas y de sus efectos pleiotrópicos y la redundancia de los mecanismos generadores de inflamación,

no hacen obvio que los Acs que generan dichas composiciones vacunales, logren deprimir selectivamente la población de neutrófilos y mucho menos que esta depleción se traduzca en un efecto anti-inflamatorio y anti-tumoral.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una realización es objeto de la presente invención una composición vacunal terapéutica para inducir respuesta inmune contra factores de crecimiento hematopoyéticos que comprende una proteína transportadora, un adyuvante y al menos un antígeno que puede ser el rG-CSF o el rGM-CSF.

- 10 Entre las proteínas transportadoras que emplean estas composiciones vacunales están: la toxina B del cólera, toxoide tetánico, KLH, P64k de *Neisseria meningitidis*, toxoide diftérico, péptidos que son capaces de presentar epítopes T contra el G-CSF y el GM-CSF, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, región Fc de anticuerpos, fragmentos variables de anticuerpos y proteínas de bacterias, levaduras o mamíferos. Estas
- 15 proteínas transportadoras se pueden unir al antígeno mediante métodos conjugación química o fusión.

- Los adyuvantes que se pueden emplear en las composiciones vacunales de la presente invención son: adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, adyuvantes a base de escualeno, adyuvantes de origen sintético, adyuvantes de origen
- 20 mineral, adyuvantes de origen vegetal, adyuvantes de origen animal, adyuvantes proteicos particulados, adyuvantes del tipo proteoliposomas, liposomas y mezcla de cualquiera de las anteriores.

- En una realización particular la presente invención se relaciona con el uso de las composiciones vacunales aquí descritas en el tratamiento de enfermedades
- 25 inflamatorias que se seleccionan del grupo que comprende: cáncer, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la uveítis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso, enfermedad de Crohn, asma, dermatitis, síndrome de liberación de citocinas y en las enfermedades donde la degranulación celular juega un importante papel.

- 30 En otra realización se describe un método de tratamiento a un sujeto que lo necesite que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva en un rango entre 0.01 y 10 mg/kg de peso de las composiciones vacunales de la presente invención. Particularmente, se realiza una etapa de inducción de respuesta inmunológica producida entre 1 y 6 dosis administradas al menos semanalmente y otra
- 35 de mantenimiento de dicha respuesta inmunológica entre 1 dosis y hasta que ocurra toxicidad limitante de su uso, administrada al menos semanalmente. Este método

comprende la administración de las composiciones vacunales ya sea por vía : intramuscular, subcutánea o intratumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

Composiciones vacunales

La presente invención comprende la obtención de preparados vacunales para inducir respuesta inmune contra los factores de crecimiento hematopoyéticos G-CSF y GM-CSF y que producen una disminución del número de neutrófilos circulantes, un efecto antiproliferativo y un elevado efecto antitumoral *in vivo*.

10

El principio activo de las composiciones vacunales de la presente invención es un conjugado proteico entre el antígeno (G-CSF y/o GM-CSF) enlazados a una proteína transportadora. Dicha proteína transportadora se selecciona aunque no se limita a la toxina B del cólera, toxoide tetánico, KLH, P64k de *Neisseria meningitidis*; toxoide diftérico y péptidos que son capaces de presentar epítopes T contra el G-CSF y el GM-CSF. En los conjugados anteriores la proteína puede estar fusionada a inmunoglobulinas G, inmunoglobulinas M, región Fc de Acs ya sea humana o de otra especie animal; dicha región Fc puede ser una variante de unión limitada a receptores Fc consistente en una IgG1 mutada en la región Cy2 con las mutaciones L234A y L235A.

15

Además, los conjugados se pueden fusionar a fragmentos variables de Acs, o a proteínas de bacterias, levaduras o mamíferos.

20

Adicionalmente, los conjugados proteicos antes descritos comprenden un adyuvante, lo que potencia o complementa su respuesta de Acs anti-G-CSF y/o anti-GM-CSF. Estos adyuvantes pueden ser: el adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, adyuvantes a base de escualeno, adyuvantes de origen sintético, adyuvantes de origen mineral, adyuvantes de origen vegetal, adyuvantes de origen animal, adyuvantes proteicos particulados, adyuvantes del tipo proteoliposomas, liposomas o mezcla de cualquiera de las anteriores.

25

Los sistemas anti-G-CSF y/o anti-GM-CSF comprendidos en la presente invención utilizan excipientes farmacéuticos adecuados. Entre ellos incluyen, aunque no se limitan a: agua para inyección, cloruro de sodio, sales de fósforo y potasio, cloruro de calcio, citrato e hidróxido de sodio y EDTA. Pueden inocularse a pacientes en formulaciones parenterales de concentraciones de proteínas de 0,01 a 10 mg/mL y dosis comprendidas entre 10-100 µL/kg o 10-100 µg de proteínas totales por kilogramo o hasta 5 mg de proteínas totales, siendo más recomendable 10-60 µg/kg.

30

35

El almacenamiento de la composición terapéutica puede realizarse utilizando su forma líquida a temperaturas entre -80°C y 8°C o luego de un proceso de liofilización a temperaturas entre 2-8°C.

5 Obtención del conjugado químico entre la proteína transportadora y el G-CSF recombinante (rG-CSF) y/o el G-CSF recombinante (rGM-CSF)

- A partir de la evaluación y optimización de las condiciones para la reacción química de conjugación entre las proteínas rGCSF y/o rGM-CSF y alguna de las proteínas transportadoras antes mencionadas, se desarrolla un método de conjugación química
- 10 que requiere de una elevada proporción molar de la proteína autóloga, para garantizar una elevada eficiencia de conjugación entre ambas durante la conjugación. El exceso necesario de proteína autóloga durante la conjugación, se elimina seguidamente a través del método de purificación por membranas de ultrafiltración, el cual permite la obtención del preparado vacunal con elevada homogeneidad.
- 15 El procedimiento descrito en la presente invención garantiza una adecuada conjugación química entre ambas proteínas y consta de un solo paso. Se inicia mezclando las proteínas rGCSF y/o rGM-CSF concentradas previamente en un rango entre 0.1 y 1 mg/mL y la molécula a la que se conjugará en un rango entre 0.6 y 20 mg/mL en el reactor de conjugación. A esta mezcla proteica se le añade posteriormente la solución
- 20 PBS/MgCl₂ (pH 6.0-7.2) y la solución de conjugación de glutaraldehído en un rango entre 0.1-0.8 %. La mezcla se mantiene en agitación constante entre 15 minutos y 4 horas a una temperatura entre 20 y 24°C± 2°C. La concentración de proteínas totales durante la reacción de conjugación es de 1-20 mg/mL.
- Posteriormente, se lleva a cabo una purificación empleando membranas de
- 25 ultrafiltración en un rango entre 50-100kDa y que consta de dos etapas. En la etapa inicial se realizan sucesivos cambios de solución tampón (diafiltración) para remover el glutaraldehído y eliminar el exceso de proteína autóloga, ya sea libre o formando conjugados de solo la proteína rGCSF o solo la proteína rGM-CSF de diferentes tallas. Durante esta etapa se realizan entre 3 y 15 cambios de solución tampón. La segunda
- 30 etapa es la concentración del conjugado químico purificado.
- El preparado terapéutico obtenido por purificación a través de membrana se caracteriza por una relación de conjugación química entre las proteínas rGCSF y la molécula a la cual se conjuga en un rango entre 5:1 a 20:1, y libre de glutaraldehído.

35

Obtención de la composición terapéutica por el método de expresión de proteínas de fusión

Las composiciones vacunales de la presente invención se pueden obtener además mediante el diseño de construcciones genéticas basadas en los genes de rG-CSF y rGM-CSF clonados en un vector de expresión preferentemente PCMX, sin limitarse a este, y fusionados a los genes de alguna de las proteínas transportadoras antes mencionadas. Las células que se utilizan en la transfección pueden ser HEK-293T, HEK-293-GE, Expi 293, HEK-293 o CHO_{K1}. Los sobrenadantes de las células transfectadas se colectan después de 6-10 días de cultivo. Luego se purifican dichas proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por proteína A o por cromatografía de afinidad a iones metálicos.

Métodos de tratamiento

Los sistemas descritos anteriormente son eficaces en el mantenimiento de la respuesta inmunológica anti-G-CSF y/o anti-GM-CSF, con previa inducción de Acs generados por los sistemas descritos en esta invención. Son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias donde el G-CSF y el GM-CSF tienen un rol relevante. Entre estas enfermedades se incluyen (pero no se limitan) al cáncer (especialmente aquellos tumores dependientes de G-CSF o GM-CSF), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la uveítis, la artritis, la espondilitis anquilosante, lupus eritematoso, la enfermedad de Crohn, asma, dermatitis, síndrome de liberación de citocinas y en las enfermedades donde la degranulación celular juega un importante papel.

Las dosis aprobadas para su uso en humanos o animales, serán administradas entre 1 y 6 dosis de inducción suministradas al menos semanalmente y luego en una etapa de mantenimiento de la respuesta inmunología se suministran entre 1 dosis y hasta que ocurra toxicidad limitante de su uso, administradas, al menos semanalmente pero también puede ser de forma quincenal, mensual, trimestral o anual, por vía intramuscular, subcutánea o intratumoral.

La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Caracterización del sistema rG-CSF-P64k mediante electroforesis SDS PAGE.

Figura 2. Caracterización del sistema rG-CSF acoplado a Fc (rG-CSF-Fc) y rGM-CSF acoplado a Fc (rGM-CSF-Fc) mediante electroforesis SDS PAGE.

Figura 3. Estudio cinético de la producción de títulos de Acs anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-P64k, sola o combinada con G-CSF.

- 5 **Figura 4. A)** Producción de títulos de anticuerpos anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-P64k, a diferentes dosis; **B)** Cinética de la producción de títulos de anticuerpos anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-P64k, a diferentes dosis.

- 10 **Figura 5.** Evaluación del conteo de neutrófilos circulantes después de la administración de la composición terapéutica rG-CSF-P64k, sola o combinada con G-CSF.

Figura 6. Inhibición de la proliferación celular inducida por los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la composición terapéutica rGCSF-P64k.

- 15 **Figura 7.** Evaluación del efecto anti-inflamatorio después de la administración de la composición terapéutica rGCSF-P64k en un modelo de inflamación provocado por la aplicación de aceite de croto. **A)** Disminución del conteo de neutrófilos circulantes, **B)** Disminución del edema auricular.

Figura 8. Estudio cinético de producción de títulos de Acs anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-Fc, sola o combinada con G-CSF.

- 20 **Figura 9 A)** Estudio de la producción de títulos de anticuerpos anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-Fc, a diferentes dosis **B)** Cinética de la producción de títulos de anticuerpos anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-Fc, a diferentes dosis.

Figura 10. Estudio cinético de producción de títulos de anticuerpos anti-G-CSF tras la administración de la composición terapéutica rG-CSF-Fc en la línea Balb/c

- 25 **Figura 11.** Evaluación del conteo de neutrófilos circulantes después de la administración de la composición terapéutica rG-CSF-Fc, sola o combinada con G-CSF.

Figura 12. Inhibición de la proliferación celular inducida por los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la composición terapéutica rGCSF-Fc.

- 30 **Figura 13.** Estudio cinético de producción de títulos de Acs anti-GM-CSF tras la administración de la composición terapéutica rGM-CSF-Fc.

Figura 14 A). Estudio de la producción de títulos de anticuerpos anti-GM-CSF tras la administración de la composición terapéutica rGM-CSF-Fc, a diferentes dosis **B)** Cinética de la producción de títulos de anticuerpos anti-GM-CSF tras la administración de la composición terapéutica rGM-CSF-Fc, a diferentes dosis.

- 35 **Figura 15.** Inhibición de la proliferación celular inducida por los sueros obtenidos de ratones inmunizados con la composición terapéutica rGMCSF-Fc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de un conjugado químico entre la proteína recombinante rP64k y el rG-CSF

La obtención del conjugado químico entre las proteínas rGCSF y P64k en relación 20:1, se inicia con 17.6 mg de la proteína GCSF, se adicionan 3 mg de la proteína transportadora P64k en una solución buffer $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (0.01 M) y la solución de conjugación de glutaraldehído 0.5% en un reactor con agitación por 1 hora. Posteriormente, los detergentes las impurezas y proteínas no conjugadas se eliminan a través de un sistema de ultrafiltración. Este proceso se lleva a cabo utilizando un tampón que contiene polisorbato 80, sorbitol, acetato de sodio, ácido acético y agua para inyección. Durante esta operación se realizan 7 cambios de tampón. La solución remanente ultrafiltrada se concentra para ajustar su concentración a la dosificación de 1 mg/ml. Posteriormente es almacenado a 2-8°C.

La pureza de las proteínas purificadas se evaluó en gel de SDS-PAGE al 10 % y una masa de proteínas de 1 µg. La Figura 1 muestra que la composición vacunal obtenida se corresponde aproximadamente con un peso molecular de 200kD.

Ejemplo 2. Obtención de composiciones terapéuticas mediante el método de expresión de proteínas de fusión.

Se diseñó una construcción genética basada en el gen del G-CSF y otra con el del GM-CSF fusionados a la región Fc de inmunoglobulina G1 humana y clonados en el vector de expresión PCMX. Se transfectaron a células Expi 293, con la construcción genética evaluada mezclada con polietilenimina. Se colectaron los sobrenadantes de las células transfectadas después de 6 días de cultivo. Se purificaron dichas proteínas recombinantes por afinidad a una matriz de proteína A. La pureza de las proteínas purificadas se evaluó en gel de SDS-PAGE al 7,5 %, la masa de G-CSF-Fc empleada fue de 2 µg y en el caso de GM-CSF-Fc fue de 9 µg.

La Figura 2 muestra que el peso molecular de ambas composiciones evaluadas se corresponde aproximadamente con 35 kD.

Ejemplo 3. La composición terapéutica rG-CSF-P64k induce Acs anti-G-CSF.

Se inmunizaron ratones de la línea C57BL/6 (n=5) los días 0, 7, 21, 35 y 42 por vía intramuscular con 50 µg/Kg de peso de la formulación del Ejemplo 1 adyuvada en Montanide (V/V 1:1). A partir del día 14 se les administró también G-CSF o PBS por vía subcutánea tres veces por semana.

Se extrajo sangre para procesar el suero los días 0 (preinmune), 14, 35 y 56. Se determinó mediante ELISA el título de Acs específicos contra el G-CSF. Para ello las

placas se recubrieron con 5 µg/mL de G-CSF, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después del correspondiente bloqueo, se añadieron diluciones del suero (1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/20000). La reacción se visualizó utilizando un conjugado de Acs anti-IgG murina/fosfatasa alcalina (Sigma), y el correspondiente sustrato de la enzima. La absorbancia se leyó a 405 nm. El suero pre-inmune se utilizó como control negativo. El título de Acs se definió como la máxima dilución de suero, que mostró una lectura de densidad óptica (DO) del ELISA, más cinco desviaciones estándar sobre la DO media obtenida en los pozos que contenían suero pre-inmune

- 5 Se utilizó la media geométrica de los títulos de Acs anti-G-CSF evaluados por ELISA de cada grupo experimental, para definir la condición de la respuesta inmune.
- 10 Los ratones inmunizados desarrollaron Acs específicos, que alcanzaron títulos por encima de 1/10000 lo que demuestra que la composición vacunal induce una respuesta inmunológica contra el G-CSF propio (Figura 3).

Ejemplo 4. La composición terapéutica rG-CSF-P64k a diferentes concentraciones induce anticuerpos anti-G-CSF.

- 15 Se inmunizaron ratones de la línea C57BL/6 (n=5) con 6 dosis en intervalos de 14 días por vía intramuscular a diferentes concentraciones 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg de la formulación del Ejemplo 1 adyuvada en Montanide (V/V 1:1). A partir de la segunda inmunización se les administró también G-CSF o PBS por vía subcutánea 2 veces por semana.

- 20 Se extrajo sangre para procesar el suero los días 0 (pre-inmune) y quince días posterior a cada inmunización. Se determinó mediante ELISA el título de anticuerpos específicos contra el G-CSF. Para ello las placas se recubrieron con 5 µg/mL de G-CSF, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después del correspondiente bloqueo, se añadieron diluciones del suero (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000). A continuación, se siguió el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3.

- 25 Los ratones inmunizados desarrollaron anticuerpos específicos, que alcanzaron títulos por encima de 1/1000 a diferentes concentraciones de la composición vacunal, lo que demuestra la inducción de una respuesta inmunológica contra el G-CSF. Existen diferencias significativas entre los títulos obtenidos en los ratones inmunizados con diferentes dosis del antígeno (Figura 4A). Esto demuestra una dependencia de la dosis entre los grupos inmunizados con respecto a la respuesta obtenida medida como título de anticuerpos.

- 30 La respuesta inmune humoral se evaluó, además, a diferentes intervalos de tiempo correspondientes a la 3, 4, 5 y 6 dosis de la composición vacunal. El título de anticuerpos de todos los animales inmunizados a diferentes concentraciones de la preparación

vacunal se incrementa de manera dependiente de la dosis, alcanzándose una meseta del título de anticuerpos a partir de la 5ta inmunización. (Figura 4B).

Ejemplo 5. La composición terapéutica rG-CSF-P64k disminuye el conteo de neutrófilos circulantes en ratones C57BL/6.

- 5 Se inmunizaron ratones C57BL/6 (n=5) con la formulación vacunal del Ejemplo 1 adyuvada en Montanide (V/V 1:1), siguiendo el esquema de inmunización del Ejemplo 3. A partir del día 14 se les administró también G-CSF o PBS por vía subcutánea 3 veces por semana. En los días 0 (Pre-inmune), y 56 de la primera inmunización, se extrajo la sangre periférica del seno maxilar de los animales y se colectó en viales con EDTA (40
- 10 μ L de sangre) para el conteo de neutrófilos utilizando un microscopio Carl Zeiss. Se comprobó la normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov, la homogeneidad de varianzas por el Test de Levene y se realizó una prueba t de Student pareada entre los valores de cada animal antes de la inmunización y en los días 35 y 56. Se trabajó para un nivel de significación de $p < 0.05$. En los animales tratados con el conjugado G-CSF-
- 15 P64k, se observó una reducción estadísticamente significativa de los neutrófilos el día 56, lo que sugiere que esta composición farmacéutica es capaz de provocar neutropenia mediante los Acs anti-G-CSF que genera (Figura 5). Hay que destacar además que la neutropenia no implicó una disminución en la supervivencia de los ratones

Ejemplo 6. La composición terapéutica rG-CSF-P64k inhibe la proliferación celular de la línea mieloblástica murina NFS60.

- 20 Utilizando la composición terapéutica del Ejemplo 1 y el esquema de inmunización descrito en el Ejemplo 3 se evaluó mediante un ensayo de proliferación celular en la línea mieloblástica murina NFS60 (dependiente de G-CSF), los efectos del suero obtenido a los 14 y 28 días luego de la inmunización de ratones C57BL/6.
- 25 Las células se descongelaron previamente y fueron mantenidas en cultivo por 48 horas para alcanzar un crecimiento exponencial. Las condiciones de incubación durante todo el ensayo fueron temperatura 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de 10000 células por pozo en presencia de la formulación vacunal que tiene como principio activo el conjugado
- 30 proteico rP64k-rG-CSF a las diluciones 1/250; 1/500 y 1/1000. Se empleó el material de referencia de hG-CSF (MRT (QFB) G-CSF/1905) a las mismas concentraciones como control positivo de estos ensayos y como control negativo se incluyeron células con medio sin G-CSF. Después de 48 horas de incubación, se adicionaron 20 μ L por pozo de Alamar Blue y se incubaron durante 6 horas. Las placas fueron leídas a 540 y 620
- 35 nm. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

La Figura 6 muestra que con la administración de la composición vacunal se produce una inhibición de la proliferación dependiente de la dilución (a menor dilución más efecto) y del tiempo desde el inicio del tratamiento, pues a los 28 días se evidenció mayor efecto inhibitorio que a los 14 días, lo que demuestra que la formulación vacunal

5 inhibe el efecto proliferativo del G-CSF clave en la granulopoyesis en la línea tumoral evaluada.

Ejemplo 7. La composición terapéutica rG-CSF-P64k presenta efecto anti-inflamatorio.

Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea los días 0, 7 y 21 con 50 µg/Kg de peso de la formulación vacunal del Ejemplo 1, en Adyuvante Completo de Freund (V:V 1:1). El resto de las inmunizaciones se realizaron Adyuvante Incompleto de Freund. Como grupo control se emplearon ratones a los que se les administró por igual vía y frecuencia, solución salina.

10

Se les aplicó a los animales 10 µL de aceite de croto al 0,4 % por vía tópica, en cada cara de la oreja derecha los días 0, 7 y 21. En la oreja izquierda se aplicó igual volumen de solución salina. El día 0 y el día 20, antes del inicio de la administración del aceite de croto, se tomaron muestras de sangre de todos los animales para conteo de neutrófilos. El día 35 transcurridas 4 h de la aplicación de la sustancia irritante, se sacrificaron los animales y se le determinó la respuesta al edema auricular. Para ellos se tomaron

15

20 fragmentos de tejido de 6 mm de diámetro de las orejas y se pesaron en balanza analítica. Con los pesos obtenidos de los discos de ambas orejas, de cada animal, se calculó el edema producido y el porcentaje de inhibición de la inflamación, considerando:

Edema= Peso oreja inflamada (oreja derecha) - Peso oreja no inflamada (oreja izquierda)

25

% inhibición de la inflamación = $[(P_c - P_t) / P_c] \times 100$,

donde:

P_c: media aritmética de la variación de peso en el grupo control,

P_t: media aritmética de la variación de peso en el grupo tratado.

Se empleó el paquete estadístico MINITAB (Minitab Inc. Versión 16.1.0. MINITAB, 2010) para el procesamiento de los datos, estableciendo un nivel de confianza del 90% en la interpretación de los resultados. Los datos fueron comparados entre grupos; analizando normalidad y homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (KS) y de Levene respectivamente. Para determinar si hubo diferencias significativas

30

entre los grupos experimentales se realizó la prueba paramétrica t de Student (conteo de neutrófilos) y U de Mann Whitney para el edema.

Como resultado del proceder anterior, el día 20 se detectó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.1$) en el conteo de neutrófilos del grupo tratado con conjugado GCSF-P64K respecto al grupo control, (Figura 7A) mientras que el día 35 se detectó una inhibición de la inflamación aguda en el grupo tratado con conjugado GCSF-P64K respecto al grupo control, caracterizado por una reducción de un 53.85% estadísticamente significativa ($p < 0.1$) en el edema auricular provocado por aceite de croto (Figura 7B), lo que indica que la preparación vacunal tiene un efecto antiinflamatorio en un modelo de inflamación aguda.

Ejemplo 8. La composición terapéutica rG-CSF-Fc induce respuesta de Acs.

Se inmunizó un grupo de cinco ratones C57BL/6 los días 0, 14, 28 y 42 por vía intramuscular con 20 $\mu\text{g/kg}$ de la composición vacunal descrita en el Ejemplo 2 que tiene como antígeno el G-CSF acoplado a Fc y adyuvado en Montanide. Se extrajo sangre para procesar el suero los días 14 y 56 y se determinaron los títulos de Acs específicos contra el G-CSF mediante el ELISA. Para ello se recubrieron placas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de G-CSFh con una cola de 6 moléculas de histidina, de 16 a 20 h a 4 °C. Las placas se bloquearon con leche descremada en polvo al 4 % diluida en Solución Salina Tamponada por Fosfatos por 1 hora a 25 °C. Se añadieron las diluciones seriadas de suero de ratones inmunizados y de suero pre-inmune en solución de bloqueo (1/10-1/107) y se incubó por 1 hora a 25 °C. Se realizaron 6 lavados de una solución Tween20 0.1% (V:V). Se añadió un conjugado anti-inmunoglobulinas IgG de ratón-peroxidasa de rábano picante (Sigma, A2554-1 mL) diluido 1:35000 en solución de bloqueo y se incubó por 1 hora a 25 °C. Para el desarrollo de color se empleó ortofenilendiamina (0,5 mg/mL) (Sigma, USA) en solución Tampón Sustrato (Na_2HPO_4 200 mmol/L, ácido cítrico 100 mmol/L, pH=5) con Peróxido de hidrógeno al 0,015 % durante 30 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo con H_2SO_4 al 10 %. La absorbancia se determinó a 490 nm en el lector de ELISA Dialab GmbH, ELx808.

El título se determinó como la mayor dilución para la cual se observó una absorbancia de al menos dos veces el valor de absorbancia del suero pre-inmune del mismo animal. Los resultados que se muestran en la Figura 8 corresponden a la titulación del suero obtenido en los días 14 y 56. En el gráfico se observa que la inmunización contra el G-CSFh fue capaz de generar una respuesta de tipo humoral y de alto título en los ratones contra dicha citocina.

35

Ejemplo 9. La composición terapéutica rG-CSF acoplado a Fc a diferentes concentraciones induce anticuerpos anti-G-CSF.

- Se inmunizaron ratones de la línea C57BL/6 (n=7) con 6 dosis en intervalos de 14 días por vía intramuscular a diferentes concentraciones 80, 40, 20, 10 y 5 µg de la formulación del Ejemplo 2 que tiene como antígeno el GCSF acoplado a Fc y adyuvado en Montanide (V/V 1:1). Se extrajo sangre para procesar el suero los días 0 (pre-inmune) y catorce días después de cada inmunización. Se determinó mediante ELISA el título de anticuerpos específicos contra el G-CSF y a continuación se siguió el procedimiento del Ejemplo 3.
- Los ratones inmunizados desarrollaron anticuerpos específicos, que alcanzaron títulos por encima de 1/1000 sin diferencias estadísticas entre los grupos inmunizados a diferentes concentraciones de la composición vacunal, lo que demuestra la inducción de una respuesta inmunológica contra el G-CSF que no es dependiente de la dosis en el intervalo evaluado (Figura 9A).
- Se evaluó la respuesta inmune humoral a diferentes intervalos de tiempo siguiéndose el procedimiento del Ejemplo 4 para los animales inmunizados con 40 y 5 ug de la composición vacunal. La cinética del título de anticuerpos se mantuvo en fase de meseta a partir de la 3ra inmunización con pequeñas variaciones luego de la 4ta dosis. En el desarrollo de la respuesta humoral en el tiempo se mantiene la no dependencia con la concentración (Figura 9B)

Ejemplo 10. La composición terapéutica rG-CSF-Fc en la línea Balb/c induce anticuerpos anti-G-CSF.

- Se inmunizaron ratones Balb/c con la composición terapéutica del Ejemplo 2 que tiene como antígeno el G-CSF fusionado al Fc con 5 dosis de 5ug por vía subcutánea adyuvado en Montanide, separadas en intervalos de 14 días. Se extrajo sangre los días 0 (pre-inmune), 42, 70 y 77.
- Se determinó mediante ELISA el título de anticuerpos específicos contra el G-CSF para las diferentes extracciones de suero. Para ello las placas se recubrieron con 5ug/mL de G-CSF, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después del correspondiente bloqueo, se añadieron diluciones del suero (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000) y luego se procedió como se describe en el Ejemplo 3.
- Los ratones Balb/c inmunizados desarrollaron anticuerpos específicos, que alcanzaron títulos medios de 1/10000 lo que demuestra que la composición vacunal induce una respuesta inmunológica fuerte contra el G-CSF (Figura 10).

Ejemplo 11. La composición terapéutica rG-CSF-Fc disminuye el conteo de neutrófilos circulantes en ratones C57BL/6.

A ratones C57BL/6 (n=5) se les administró 20µg/Kg de peso de la composición vacunal descrita en el Ejemplo 2 que tiene como antígeno el G-CSF acoplado a Fc y adyuvado en Montanide y siguiendo el esquema de inmunización descrito en el Ejemplo 3. Se evaluó el conteo de neutrófilos utilizando un microscopio Carl Zeiss. Los días 0 (Pre-inmune) y 56 de la primera inmunización, se extrajo la sangre periférica del seno maxilar de los animales y se colectó en viales con EDTA (40 µl/mL de sangre). Se efectuó el conteo de neutrófilos utilizando un microscopio Carl Zeiss.

- 5
- 10 Se comprobó la normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el Test de Levene y se realizó una prueba t de Student pareada entre los valores de cada animal antes de la inmunización y en los días 35 y 56, se trabajó para un nivel de significación de $p < 0.05$.

- Se observó una reducción estadísticamente significativa de los neutrófilos, el día 56 en los animales tratados con el conjugado GCSF-P64k, lo que sugiere que esta composición farmacéutica es capaz de provocar neutropenia mediante los Acs anti-G-CSF que genera (Figura 11). Hay que destacar además que la neutropenia no implicó una disminución en la supervivencia de los ratones
- 15

Ejemplo 12. La composición terapéutica rGCSF-Fc inhibe la proliferación celular de la línea mieloblástica murina NFS60.

20

Se inmunizaron ratones C57BL/6 con la composición terapéutica del Ejemplo 2 que tiene como antígeno el G-CSF fusionado al Fc con 40 y 5 ug en 7 dosis por vía intramuscular adyuvado en Montanide, separadas en intervalos de 14 días.

- Se evaluó mediante un ensayo de proliferación celular en la línea mieloblástica murina NFS60 (dependiente de G-CSF), los efectos de los sueros obtenidos el día 0 (pre-inmune) y al finalizar el esquema de inmunización y se siguió el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.
- 25

- La Figura 12 muestra que con la administración de la composición vacunal se produce inhibición de la proliferación y no así los sueros de animales no inmunizados (pre-inmune), lo que demuestra que la formulación vacunal inhibe el efecto proliferativo del G-CSF clave en la granulopoyesis en la línea NFS60. La inhibición de la proliferación de los sueros evaluados no muestra dependencia con la concentración de la composición vacunal.
- 30

35

Ejemplo 13 La composición terapéutica rGM-CSF acoplado a Fc induce respuesta de Acs.

- Se inmunizó un grupo de cuatro ratones BALB/c con 20 µg de GM-CSF humano fusionado a una cadena Fc de IgG1 por vía subcutánea. Se extrajo el suero de los ratones dos días antes de la primera inmunización para emplearlo como control de suero pre-inmune. Se realizaron seis inmunizaciones separadas por intervalos de 14 días y se extrajo sangre siete días después de la sexta dosis. El día 0 se inmunizó con 20 µg de la proteína emulsionados en Adyuvante Completo de Freund (V:V 1:1). El resto de las inmunizaciones se realizaron Adyuvante Incompleto de Freund.
- Los días 0, 35, 49 y 77 se realizó extracción de sangre y con el suero se determinó el título de Acs contra el GM-CSF mediante ELISA. Para ello se recubrieron placas de 96 pozos con 5 µg/mL de GM-CSF humano disueltos en tampón fostato salino de 16 a 20 h a 4 °C. Las placas se bloquearon con leche descremada en polvo al 4 % diluida en tampón fostato salino por 1 hora a 25 °C. Se añadieron las diluciones seriadas de suero de ratones inmunizados y de suero pre-inmune en solución de bloqueo (1/10-1/10⁷) y se incubó por 1 hora a 25 °C. Se realizaron 6 lavados de una solución Tween 20 0.1% (V:V). Se añadió un conjugado anti-inmunoglobulinas IgG de ratón-peroxidasa de rábano picante diluido 1/35000 en solución de bloqueo y se incubó por 1 hora a 25 °C. Para el desarrollo de color se empleó ortofenilendiamina (0,5 mg/mL) en solución Tampón Sustrato (Na₂HPO₄ 200 mmol/L, ácido cítrico 100 mmol/L, pH=5) con Peróxido de hidrógeno al 0,015 % durante 30 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo con H₂SO₄ al 10 %. La absorbancia se determinó a 490 nm. Todas las muestras se aplicaron por duplicado y el título de anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados se consideró como la mayor dilución para la cual se observó una absorbancia de al menos dos veces el valor de absorbancia del suero pre-inmune del mismo animal.
- En Figura 13 el gráfico se observa que la inmunización contra el GM-CSF humano generó una alta respuesta con títulos de hasta 1x10⁷. Los resultados indican que la inmunización fue capaz de generar una respuesta de tipo humoral y de alto título en los ratones contra dicha citocina.

Ejemplo 14. La composición terapéutica rGM-CSF-Fc a diferentes concentraciones induce anticuerpos anti-GM-CSF.

- Se inmunizaron ratones de la línea C57BL/6 (n=7) con 6 dosis en intervalos de 14 días por vía intramuscular a diferentes concentraciones 40, 20, 10, 5 y 2.5 µg de la formulación del Ejemplo 2 que tiene como antígeno el GM-CSF acoplado a Fc y adyuvado en Montanide (V/V 1:1).

Se extrajo sangre para procesar el suero los días 0 (pre-inmune) y catorce días después de cada inmunización. Se determinó mediante ELISA el título de anticuerpos específicos contra el GM-CSF. Para ello las placas se recubrieron con 5 µg/mL de GM-CSF, se incubaron a 37°C durante 1 hora siguiéndose el procedimiento del Ejemplo 4.

- 5 Se utilizó la media geométrica de los títulos de anticuerpos anti-GM-CSF evaluados por ELISA de cada grupo experimental, para definir la condición de la respuesta inmune.

Los ratones inmunizados desarrollaron anticuerpos específicos, que alcanzaron títulos por encima de 1/1000 sin diferencias estadísticas entre los grupos inmunizados a diferentes concentraciones de la composición vacunal, lo que demuestra la inducción

- 10 de una respuesta inmunológica contra el GM-CSF que en el rango de dosis evaluado no depende de la concentración (Figura 14A).

Se evaluó la respuesta inmune humoral a diferentes intervalos de tiempo siguiéndose el procedimiento del Ejemplo 4 para los animales inmunizados con 20 y 5 µg de la composición vacunal. La cinética del título de anticuerpos se incrementa en

- 15 correspondencia con el número de dosis. A partir de la 5ta dosis se observa una fase de meseta donde no existen variaciones en la respuesta. En el desarrollo de la respuesta humoral en el tiempo se mantiene la no dependencia con la concentración (Figura 14B).

Ejemplo 15. La composición terapéutica rGMCSF-Fc inhibe la proliferación celular de la línea mieloblástica murina NFS60.

- 20 Se inmunizaron ratones Balb/c con la composición terapéutica del Ejemplo 2 que tiene como antígeno el GM-CSF fusionado a Fc con 5 dosis de 5µg por vía subcutánea adyuvado en Montanide, separadas en intervalos de 14 días. Se extrajo sangre el día 0 (pre-inmune) y 14 días posterior a la última inmunización.

- 25 Se evaluó mediante un ensayo de proliferación celular en la línea mieloblástica murina NFS60 (dependiente de G-CSF), los efectos de los sueros obtenidos de la inmunización y se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6.

La Figura 15 muestra que con la administración de la composición vacunal rGM-CSF-Fc se produce inhibición de la proliferación en los animales inmunizados y no en los sueros de animales no inmunizados (pre-inmune), lo que demuestra que la formulación vacunal inhibe el efecto proliferativo del G-CSF clave en la granulopoyesis en la línea NFS60

COMPOSICIONES VACUNALES DEPLETANTES DE FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

5 REIVINDICACIONES

1. Una composición vacunal terapéutica para inducir respuesta inmune contra factores de crecimiento hematopoyéticos caracterizada porque comprende una proteína transportadora, un adyuvante y al menos un antígeno que se selecciona del grupo que comprende:
 - 10 - factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante (rG-CSF) y
 - factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos recombinante (rGM-CSF).
2. La composición vacunal de la reivindicación 1 caracterizada porque la se selecciona del grupo que comprende:
 - 15 - toxina B del cólera,
 - toxoide tetánico,
 - KLH,
 - P64k de *Neisseria meningitidis*,
 - toxoide diftérico,
 - 20 - péptidos que son capaces de presentar epítopes T contra el G-CSF y el GM-CSF,
 - inmunoglobulina G,
 - inmunoglobulina M,
 - región Fc de anticuerpos,
 - 25 - fragmentos variables de anticuerpos,
 - proteínas de bacterias,
 - proteínas de levaduras y
 - proteínas de mamíferos.
3. La composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizada porque la proteína transportadora se une al antígeno mediante uno de los siguientes métodos:
 - 30 - conjugación química y
 - fusión.
4. La composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque el antígeno es el G-CSF recombinante.
- 35 5. La composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque el antígeno es el GM-CSF recombinante.

6. La composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizada porque el adyuvante se selecciona del grupo que comprende:
- adyuvante incompleto de Freund,
 - adyuvante completo de Freund,
 - 5 - adyuvantes a base de escualeno,
 - adyuvantes de origen sintético,
 - adyuvantes de origen mineral,
 - adyuvantes de origen vegetal,
 - adyuvantes de origen animal,
 - 10 - adyuvantes proteicos particulados,
 - adyuvantes del tipo proteoliposomas,
 - liposomas y
 - mezcla de cualquiera de las anteriores.
7. Uso de la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias que se seleccionan del grupo que comprende:
- cáncer,
 - la enfermedad pulmonar obstructiva crónica,
 - la uveítis,
 - 20 - artritis reumatoide,
 - espondilitis anquilosante,
 - lupus eritematoso,
 - enfermedad de Crohn,
 - asma,
 - 25 - dermatitis,
 - síndrome de liberación de citocinas y
 - en las enfermedades donde la degranulación celular juega un importante papel.
8. Un método de tratamiento a un sujeto que lo necesite que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva en un rango entre 0.01 y 10 mg/kg de peso de la composición terapéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
9. El método según la reivindicación 8 donde se realiza una etapa de inducción de respuesta inmunológica producida entre 1 y 6 dosis administradas al menos semanalmente y otra de mantenimiento de dicha respuesta inmunológica entre 1 dosis y hasta que ocurra toxicidad limitante de su uso, administrada al menos semanalmente.
- 35

10. El método según la reivindicación 9 donde la composición vacunal se administra por la vía que se selecciona del grupo que comprende: intramuscular, subcutánea e intratumoral.

5

10

15

20

25