



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

10-34638

54. TÍTULO

VACUNA PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INTERVET INTERNATIONAL, B.V.

DOMICILIO

BOXMEER, PAISES BAJOS

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

(FORMA P-10)

T. D. C. Com
25-04-2010

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No: 10-034638- -00000-0000

Fecha: 2010-03-24 16:39:51

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 179

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **INTERVET INTERNATIONAL,
B.V.**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de los Países Bajos.Dirección: Wim de Körverstraat 35,
5831 AN Boxmeer,
Países BajosDomicilio: Boxmeer,
Países Bajos**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P. 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Wilhelmus Gerardus Johannes DEGEN** 2. **Virgil Elisabeth Joseph Caspar SCHIJNS**Wim de Körverstraat 35,
NL-5831 AN Boxmeer,
Países BajosWim de Körverstraat 35,
NL-5831 AN Boxmeer,
Países Bajos

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/062722Fecha: 24 de septiembre de 2008Publicación Internacional No. WO 2009/040361 A1Fecha: 02 de abril de 2009

6

Título (54)**VACUNA PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS** (folio 183)

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/000

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EPUSUSEP

(32) Fecha

25 de septiembre de 200725 de septiembre de 200719 de diciembre de 200720 de diciembre de 2007

(31) Número de Solicitud

07117111.060/974,90361/014,87707150183.7

9

Comprobante de pago No.: 10-16.870Fecha: 03 de marzo de 2010Comprobante de pago No.: 10-18.592Fecha: 09 de marzo de 2010

2

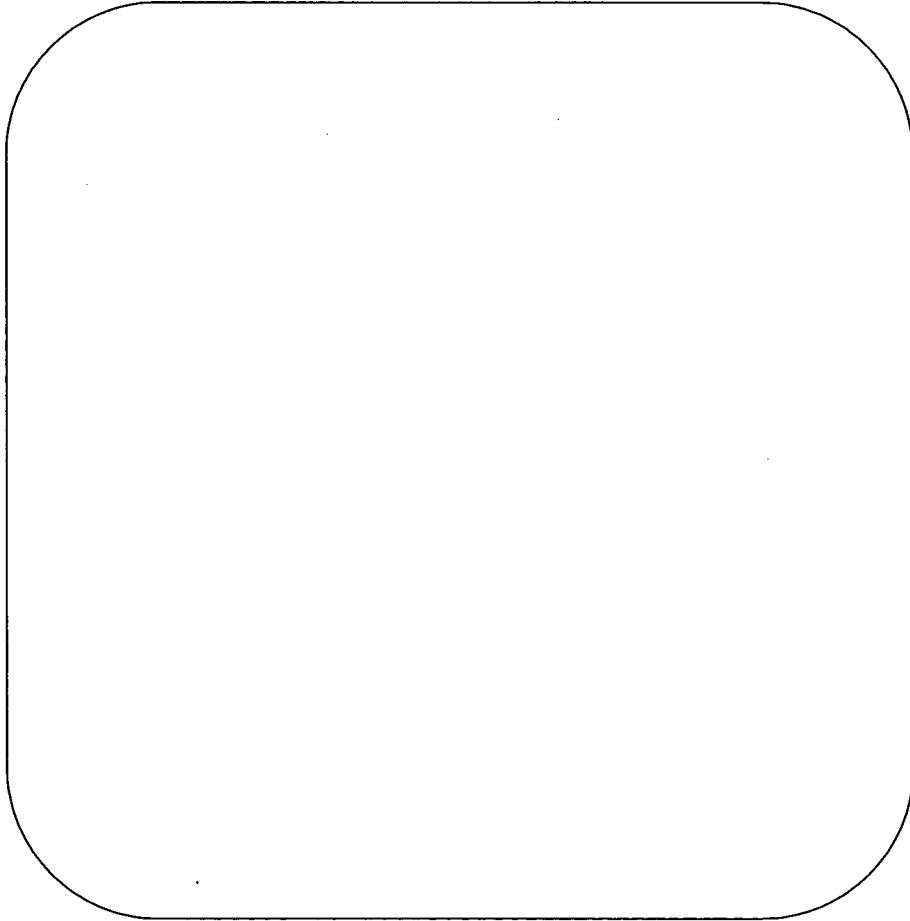
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por una reivindicación adicional después de la décima reivindicación por \$26.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia De Paez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/040361 A1

Descripción:

Páginas 30 en el idioma original

Páginas 49 en español

Reivindicaciones: Número (s) 11

Figuras: Número (s) 9

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 8

DE LA ESCRITURA NUMERO:
FECHA: 28/Enero/2010

380

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
DANIEL PERA VALENZUELA



CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO 380 /

- - -TRESCIENTOS OCHENTA /

DE FECHA: ENERO VEINTIOCHO (28) /

DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2010) /

OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6a) DEL

CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. -----

CLASE DE ACTO O CONTRATO: PODER ESPECIAL -----

DE: CAVELIER ABOGADOS -----

A : LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, DANIEL PEÑA VALENZUELA, GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES y JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL -----

En la ciudad de Bogotá D.C. República de Colombia, ante mí, JAIME VARGAS, CHAMBO ----- Notaria sexta (6a.) -(E) de éste círculo notarial, se otorgó

la presente escritura pública que se consigna en los siguientes términos: -----

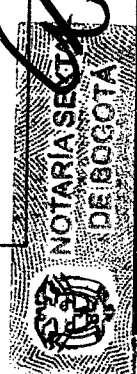
COMPARECENCIA: Con minuta escrita, compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo:-----

ESTIPULACIONES: -----

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. -----

SEGUNDA: Que **INTERVET INTERNATIONAL B.V.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Los Países Bajos, domiciliada en Wim de Körverstraat 35 5831 an Boxmeer, Países Bajos, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. -----

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **INTERVET INTERNATIONAL B.V.**, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número



35.456.344 de Usaquen, **DANIEL PEÑA VALENZUELA**, T.P.A. No. 65.620, identificado con cédula de ciudadanía número 79.518.915 de Bogotá, **GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES**, T.P.A. No. 64.239, identificado con cédula de ciudadanía número 79.155.665 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: **a)** Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos ----- **b)** Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso- administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. -----

QUINTO- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día **08 de Octubre de 2009** por **INTERVET INTERNATIONAL B.V.**, documento que está



01



* 8 8 2 2 6 8 8 6 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009

HORA 11:11:00

R027136832

PAGINA: 2 de 3

NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL	C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO	C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

28 ENE 2010

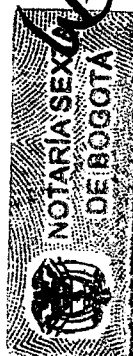
REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO. EXISTE EFECTO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO)	



C.C. 000000019066425

NOMBRE

IDENTIFICACION

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE SU FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECONSIDERACION DE LA ALCALDIA.

* * * ED PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
* * * 20 LNE 2000 FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

* * *

* * *

EL SECRETARIO DE COMERCIO CANADIENSE DE COMERCIO,

[illegible]



01



* 8 8 2 2 6 8 8 7 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009

HORA 11:11:00

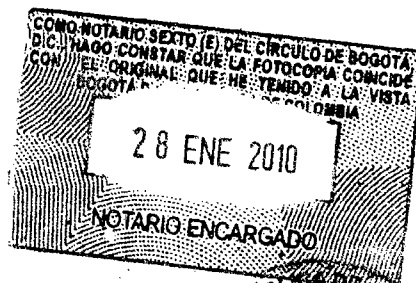
R027136832

PAGINA: 3 de 3

VALOR : \$ 3,500

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Jaime Vargas



B.v. 10

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

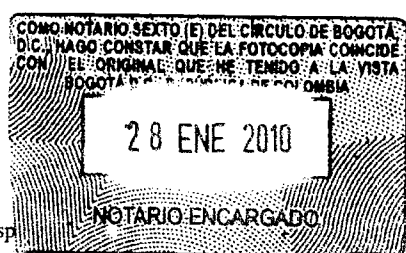
- 1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
- 2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MAUREEN PASAPANE
- 3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
- 4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MAUREEN PASAPANE, NOTARY

CERTIFIED

- 5. AT TRENTON, NEW JERSEY
- 6. THE 21ST DAY OF OCTOBER 2009
- 7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
- 8. NO: A377524
- 9. SEAL/STAMP:
- 10. SIGNATURE



[Handwritten signature]



Certificate Number: 115564923

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

DOCUMENTO DE TRASPASO Y REPRESENTACION

Yo, (nosotros), abajo firmado (s)

domiciliado (s) en

aquí llamado (s) CEDENTE(s), propietario(s) de la(s)
(s) en

como sigue:

declara(n) por el presente instrumento que cede(n) la(s)
dicha(s)

a

sociedad organizada y existente bajo las leyes de

domiciliada en

(aquí llamada la CESIONARIA). Por el presente acto, la CESIONARIA acepta dicho traspaso y nombra a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representar a la CESIONARIA, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que represente a la CESIONARIA en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

© CAVELIER ABOGADOS

COLOMBIA

13594

ASSIGNMENT WITH REPRESENTATION

I (we), the undersigned

WYETH, a Delaware Corporation
of FIVE GIRALDA FARMS, MADISON,
NEW JERSEY 07940-6874, USA
hereinafter the ASSIGNOR(s) owner of the
trademark VIDALTO
in Colombia as follows:

Registration 320-343 of
23 August 2006

declares by this document that assigns the mentioned

to Intervet International B.V.

a corporation organized and existent under the laws of

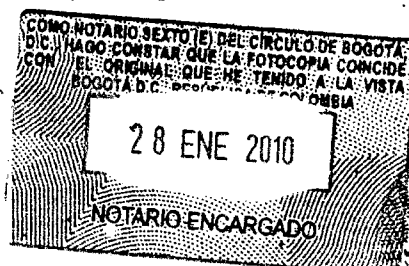
The Netherlands

and domiciled in

Wim de Kruyerstraat 35
5831 AN Bokmeer
The NETHERLANDS

(which in this document will be called the ASSIGNEE). The ASSIGNEE accepts the said assignment and do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent the ASSIGNEE, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.



La representante podrá, en nombre de la CESIONARIA, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en su nombre, como demandante, como demandada, como litisconsortes, como agente oficiosa, como tercero, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy Maureen Pasapane
MAUREEN PASAPANE
en NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 6-3-2010

State of New Jersey
County of Merri
Sworn to before me this
8 day of Oct, 2009

Cedente Bret I. Parker Assignor
Cesionario Pierre N.M. Konings Assignee
Authorized Signatory

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

© CAVELIER ABOGADOS

The representative may, in the name of the ASSIGNEE, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Given and signed this 8th day of October, 2009
in Madison, New Jersey

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

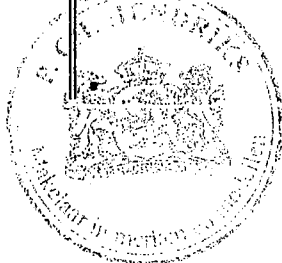
*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.



KINGDOM OF THE NETHERLANDS
Legalization inter alia ex Section 69 Code of Commerce

I, Petrus Charles HENDRIKS, "Makelaar" in Trademarks and Designs to the District Court (Gazetted 10 March 1976, No. 49), do hereby certify that the signature on this document is of Mr. Petrus Nicolaas Maria KONINGS (Netherlands Driver's License No. 3157922621), authorized signatory of Intervet International B.V. by virtue of a General Power of Attorney issued by the Board of Directors of the company dated 5 October 2009, which I have seen.

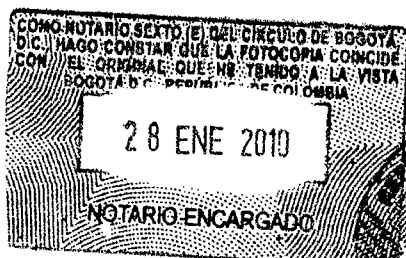
Given at Bussum, this 9th day of December 2009.



APOSTILLE

Convention de La Haye du 5 octobre 1961

1. Country: THE NETHERLANDS
This public document
2. Has been signed by: mr. P.C. Hendriks
3. Acting in the capacity of: makelaar in merken en modellen te Bussum
4. Bears the seal/stamp of:
mr. P.C. Hendriks
Certified
5. At Amsterdam
6. On 16 december 2009
7. By the clerk of the Court of Amsterdam
8. No:
9. Seal/Stamp: - 042195 10. Signature
Mw. H.H.S. Verhagen



PARA PERSONAS NATURALES

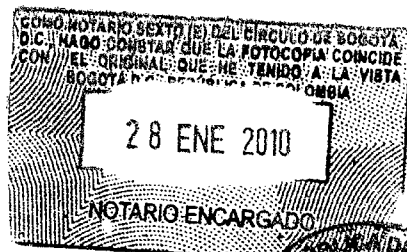
El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.



TRADUCCIÓN OFICIAL 015/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **WYETH**, UNA SOCIEDAD DE DELAWARE. DOMICILIADA EN FIVE GIRALDA FARMS, MADISON, NEW JERSEY 07940-0874, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, QUE A CONTINUACION LLAMAREMOS EL CEDENTE, PROPIETARIO DE LA MARCA VIDALTO EN COLOMBIA, NUMERO DE REGISTRO 320343 DEL 23 DE AGOSTO DE 2006, POR ESTE DOCUMENTO DECLARA QUE CEDE DICHA MARCA A INTERVET INTERNATIONAL B.V., UNA SOCIEDAD ORGANIZADA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE LOS PAISES BAJOS Y DOMICILIADA EN WIM DE KÖRVERSTRAAT 35, 5831 AN BOXMEER, PAISES BAJOS, LLAMADA EL CESIONARIO EL CUAL ACEPTA DICHA CESION Y OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS**.

DADO Y FIRMADO HOY 8 DE OCTUBRE DE 2009 EN MADISON, NUEVA JERSEY. FIRMADO: MAUREEN PASAPANE, NOTARIO PUBLICO DE NUEVA JERSEY. MI CARGO VENCE EL 6 DE MARZO DE 2010.

CEDENTE: BRET I. PARKER, SECRETARIO ASISTENTE

CESIONARIO: PIERRE N.M KONINGS, FIRMANTE AUTORIZADO

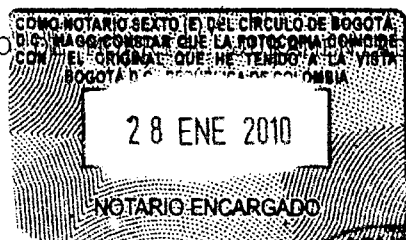
SELLO: ESTADO DE NUEVA JERSEY, CONDADO

ANTE MI HOY 8 DE OCTUBRE DE 2009.

SELLO: REINO DE LOS PAISES BAJOS

LEGISLACION: ENTRE OTRAS DISPOSICIONES LA SECCION

CODIGO DE COMERCIO



Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

Yo, Petrus Charles Hendriks, agente en marcas y diseños de la Corte del distrito (Gaceta del 10 de marzo de 1976, No. 49) por el presente certifico que la firma en este documento corresponde al señor PETRUS NICOLAAS MARIA KONINGS (Licencia de conducción holandesa 3157922621), firmante autorizado de Intervet International B.V., por virtud del poder general expedido por la junta directiva de la compañía el 6 de octubre de 2009, el cual he visto.

Expedido en Bussum, el 9 de diciembre de 2009.

Firma ilegible

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

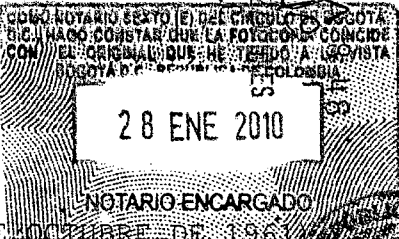
- 1. PAIS: PAISES BAJOS
- 2. Este documento público ha sido firmado por P.C. HENDRIKS
- 3. quien actúa en su calidad de AGENTE DE MARCAS DE BUSSUM
- 4. lleva el sello/estampilla de P.C. HENDRIKS

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
BOGOTÁ D.C.
2009
16
JAN 21

CERTIFICADO

- 5. En AMSTERDAM
- 6. el 16 de septiembre de 2009
- 7. Por el oficial de la corte de Amsterdam
- 8. No. 042195
- 9. Sello/estampilla: CORTE. AMSTERDAM
- 10. Firma: H.H.S. VERHAGEN

BOGOTÁ D.C.
2010
JAN 21
NOTARIO ENCARGADO
DE LEGALIZACIÓN
DEL TEXTO



APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

- 1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
- 2. Este documento público ha sido firmado por PASAPANE



Edwards Calixto



3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY

4. lleva el sello/estampilla de MAUREEN PASAPANE, NOTARIO

CERTIFICADO

5. En TRENTON, NUEVA JERSEY 6. el 21 de octubre de 2009

7. Por R. DAVID ROUSSEAU, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. NO. A377524

9. Sello/estampilla: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE NUEVA JERSEY

10. Firma: ILEGIBLE

CERTIFICADO NUMERO 115564923

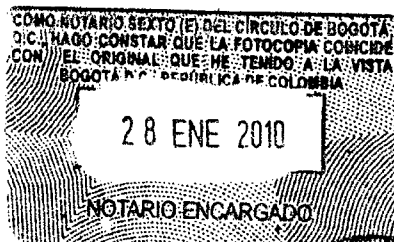
VERIFICAR ESTE CERTIFICADO EN

https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.js

ECN\ECN\ID-164223\WPCL002G

COLO-04975-704-026-3

Bogotá, 19 de enero de 2010.



Edmundo C. Vargas

152969
Edmundo Vargas

2010 JAN 21 A 8:48
JEF. DE LEGITIMACIONES
BOGOTÁ D.C.



MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO



debidamente legalizado -----

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. -----

----- HASTA AQUÍ LA MINUTA PRESENTADA -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION: LEIDA la presente escritura por los comparecientes y habiéndoseles hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartieron su aprobación y para constancia la firman ante mí el NOTARIO QUE AUTORIZA -----

DERECHOS NOTARIALES: \$ 42,860 -----

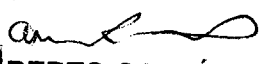
IVA 16% \$ 16.724 -----

PAPEL NOTARIAL: esta escritura ha quedado extendida en las hojas de papel sellado notarial números: -----

AA/ 42875736 /- 42875735 / -----

EN BLANCO... EN BLANCO

OTORGANTE


CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

C.C. 19066425

TEL 2116702

REPRESENTANTE LEGAL DE CAVELIER ABOGADOS





JAIME VARGAS CHAMBO
NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTÁ D.C.

15.

ES FIEL Y OCTAVA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERIO 380 DE FECHA 28 DE ENERO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO EN 10 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. 23 DE MARZO DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 April 2009 (02.04.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/040361 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/062722

(22) International Filing Date:
24 September 2008 (24.09.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07117111.0 25 September 2007 (25.09.2007) EP
60/974,903 25 September 2007 (25.09.2007) US
61/014,877 19 December 2007 (19.12.2007) US
07150183.7 20 December 2007 (20.12.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): INTER-
VET INTERNATIONAL B.V. [NL/NL]; P.O. Box 31,
Wim de Körverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DEGEN, Wilhelmus Gerardus Johannes [NL/NL]; Wim de Körverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer (NL). SCHIJNS, Virgil Elisabeth Joseph Caspar [NL/NL]; Wim de Körverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer (NL).

(74) Agents: JANSSEN, P.J.P. et al.; P.O. Box 31, NL-5830 AA Boxmeer (NL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: VACCINE FOR THE TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS

(57) Abstract: The present invention pertains to a vaccine for the treatment of osteoarthritis in a vertebrate comprising IL-1 β and optionally TNF- α cytokines or derivatives thereof, and in association with said IL-1 β and optional TNF- α or derivatives thereof a part that is non-self with respect to the vertebrate such that the vaccine elicits an immune response in the vertebrate against IL-1 β and TNF- α self-molecules of the said vertebrate.



WO 2009/040361 A1

Vaccine for the treatment of osteoarthritis

The current invention pertains to a vaccine for the treatment of osteoarthritis in a vertebrate, the use of IL-1 β and optionally TNF- α cytokines to produce such a vaccine
5 and the treatment of osteoarthritis in a vertebrate by administering the vaccine.

Osteoarthritis (OA) is a non-inflammatory degenerative joint disease occurring chiefly in older humans and animals, which is characterized by degeneration of the articular cartilage, hypertrophy of bone at the margins and changes in the synovial membrane.
10 Although this disease might arise from multiple origins, it is generally recognized that both mechanical and biochemical forces are leading causes of its appearance and progression. The disease is accompanied by pain and stiffness, particular after prolonged activity. It is a disease which is widespread under humans and animals, in particular dogs and horses, and as such is a serious issue in human as well as animal
15 health.

Patients with mild OA may be treated only with pain relievers such as acetaminophen. Many patients however, are given nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's). These NSAID's still only relieve the pain and have potentially dangerous side effects
20 including inducing stomach ulcers, sensitivity to sun exposure, kidney disturbances, nervousness and depression. Some patients are treated with corticosteroids injected directly into the joints to slow the development of OA. This however is not preferred given the potential dangerous side effects of corticosteroids. In literature it is also suggested to treat OA by in situ treatment, i.e. in the OA joint, with antagonists for
25 cytokines which are believed to play a role in mediating the increased matrix degradation that characterizes the OA cartilage lesion. This is for example known from Pelletier (Arthritis & Rheumatism, Vol. 40, No. 6, June 1997, pp 1012-1019) and Fernandes (Biorheology 39, 2002, 237-246) which describe a gene therapy treatment which is based on intra-articular injections of the interleukine receptor antagonist (IL-Ra)
30 gene, which can reduce the progression of experimentally induced lesions. However, the positive effect is very short lived, and applicability as a treatment has yet to be proven. Also, the in situ administration of monoclonal antibodies directed against a cytokine itself, in particular interleukine 6, is known from European patent application EP 1 715 891 (Warner-Lambert Company, published in 2006). Disadvantages of this
35 treatment are the high doses required which makes the treatment inherently expensive, the local (invasive) administration and the short-lived effect.

It is an object of the present invention to provide a treatment for osteoarthritis which does not, or at least to a lesser extent, suffers from the disadvantages of the known treatments for OA. Treatment in this sense may include treatment to prevent OA,
5 provide relief for the clinical signs, mitigate or cure the disease or suppress progression of it after development has started.

To this end, a vaccine according to the preamble has been developed, comprising IL-1 β and optionally TNF- α cytokines or derivatives thereof, and in association with said IL-1 β
10 and TNF- α or derivatives thereof a part that is non-self with respect to the vertebrate such that the vaccine elicits an immune response in the vertebrate against IL-1 β and TNF- α self-molecules. Optionally the vaccine comprises a medium for carrying the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof associated with the non-self part.

15 A vaccine in this respect is a constitution suitable for application to a vertebrate, i.e. any living animal having joints, such as fishes, amphibians, reptiles, birds and mammals, including humans (from now on the term "animal" is used to denote any vertebrate). In general a vaccine comprises one or more antigens such as attenuated or killed microorganisms and subunits thereof, or any other substance such as a metabolite of
20 an organism. Upon administration of the vaccine to an animal, an immune response against the antigen(s) is elicited, which response should aid in preventing, ameliorating or treating a disease or disorder. Typically the antigen(s) are combined with a medium for carrying the antigens, often referred to as a "pharmaceutically acceptable carrier". Such a carrier can be any solvent, dispersion medium, coating, antibacterial and
25 antifungal agent, isotonic and absorption delaying agent, and the like that are physiologically compatible with the vertebrate. Some examples of such carrying media are water, saline, phosphate buffered saline, bacterium culture fluid, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. They may provide for a liquid, semi-solid and solid dosage form, depending on the intended mode of administration.
30 As is commonly known, the presence of a carrying medium is not essential to the efficacy of a vaccine, but it may significantly simplify dosage and administration of the antigen.

A vaccine may additionally comprise non-specific immunostimulating agents, often referred to as adjuvants. In principal, each substance that is able to favor or amplify a
35 particular process in the cascade of immunological events, ultimately leading to a better immunological response (i.e. the integrated bodily response to an antigen, in particular

one mediated by lymphocytes and typically involving recognition of antigens by specific antibodies or previously sensitized lymphocytes), can be defined as an adjuvant. Note that the adjuvant is in general not required for the said particular process to occur, but favors or amplifies the said process.

5

The vaccine of the present invention is based on the use of IL-1 β (interleukin 1 β) and TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) cytokines. Cytokines in general are non-antibody proteins released by a cell population on contact with antigens, which act as intercellular mediators in the generation of an immune response. Interleukine 1- β is a sub-group of the class of interleukines, a class of proteins that are secreted mostly by macrophages and T lymphocytes and induce growth and differentiation of lymphocytes and hematopoietic stem cells. It is a potent immuno-modulator which mediates a wide range of immune and inflammatory responses including the activation of B- and T-cells. TNF- α is the most well known member of the "Tumor Necrosis Factor" family, a family representing proteins produced i.a. by macrophages in the presence of an endotoxin and shown experimentally to be i.a. capable of attacking and destroying cancerous tumors. In the present case the vaccine comprises IL-1 β and TNF- α or derivatives thereof and in association therewith a part that is non-self with respect to the vertebrate. Non-self in this sense means that it is immunogenic in the treated animal, i.e. it is capable of eliciting an immune response. As is commonly known, by using a non-self part in association with another molecule, an immune response can be provided against this other molecule, even if this other molecule is self with respect to the animal. A non self part (or multiple parts) in association with the cytokines could simply be provided for by choosing an IL-1 β and TNF- α that is heterologous to the animal. Heterologous in this respect means not derived from the same species (as opposed to homologous). In this case, the cytokines inherently comprise in their molecular structure parts that are non-self with respect to the treated animal. Another possibility would for example be to choose a cytokine that is homologous to the treated animal, but is a mutant, or is provided with a foreign protein-part by recombinant techniques. Other ways of providing a non-self part in association with the cytokines or derivatives thereof are for example to physically or chemically couple one or more non-self molecules, a non-self structure, compound or just any non-self constitution to the cytokines. In any event, an immunogenic construct is provided wherein an operative connection exists between the cytokine or derivatives thereof and the non-self part, such that the construct is capable of eliciting an immune response against the self cytokines (i.e. IL-1 β and TNF- α).

As indicated here-above, the techniques for developing vaccines against self proteins

(also known as autologous proteins) are commonly known since the mid eighties of the 20-th century, e.g. by chemical coupling of the self protein to a large foreign and immunogenic carrier protein (US 4,161,519), or by preparation of fusion constructs between the self protein and the foreign carrier protein (WO 86/07383), or even by substituting as little as one single foreign T-helper epitope in the self protein (WO 95/05849). In these cases the non-self part of the immunogenic construct is responsible for the provision of epitopes for T-helper lymphocytes that render the breaking of autotolerance possible. It is noted that a derivative of IL-1 β and/or TNF- α in respect of the present invention means a molecule which is smaller or larger than the starting cytokine, but still comprises one or more parts that are homologous to this starting cytokine, which part or parts constitute an antigenic determinant of these cytokines. Such part may be as small as one single epitope. Using as little as one single epitope has the advantage that very specific, in fact monoclonal antibodies, can be elicited against the self IL-1 β and TNF- α . This reduces or even totally prevents the risk of cross reaction with other cytokines. This principle as such is commonly known and for example described in WO 2005/084198, WO 03/084979 and EP 218531, which explicitly disclose immunogenic peptides (i.e. peptides capable of inducing an immune response) of cytokines. It is noted that in the vaccine derivatives can be used for both cytokines at the same time, but also, that one of the cytokines is used in its natural form, and the other is a derivative of its natural form.

Applicant surprisingly found that by administering a vaccine according to the present invention, osteoarthritis can be successfully treated. In particular it has been found that when animals are vaccinated before they develop OA, less clinical signs appear when the animal actually develops OA. Clinical signs of the disease are suppressed without any severe chronic side-effects. Given these positive results, it leaves no doubt that contrary to what one would expect, adequate amounts of the elicited IL-1 β and where applicable TNF- α antibodies reach the OA joint. Knowing that cytokine antagonists when present in an OA joint suppress OA progression (see Pelletier, Fernandes and Warner-Lambert Company as mentioned here-above), the animals treated with a vaccine according to the invention are less susceptible for progression of OA. Since OA is a progressive degenerative disease, it is understood that corresponding results are obtained when treating animals with the vaccine according to the invention after they have started developing OA. Without being bound to theory, the unexpected absence of severe chronic side-effects could be explained by assuming that vaccination with the vaccine according to the invention does not lead to a complete functional blockade of

the self cytokines IL-1 β and TNF- α in the animal, but to a reduction of the concentration of these cytokines, i.a. in the joint, to a normal level.

It is noted that Goldring (Clinical Orthopaedics and Related Research, No 427S, pp
5 S27-S36) mentions that it is suggested that proinflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- α contribute to the dysregulation of chondryte function that leads to the progressive degradation of the cartilage matrix and loss of joint function. However, he also states that a recent study by Clements (Arthritis & Rheumatism, Vol. 48, No. 12, pp 3452-3463, 2003) showed that gene deletion of IL-1 β or IL-1 β converting enzyme even
10 accelerates the development of knee osteoarthritis! Thus, the prior art is ambiguous about the role of these cytokines in OA. It is not even known whether they unambiguously stimulate or suppress OA. This is acknowledged for example by a recent paper describing a research program to assess the role of cytokines in the development of OA (Baggio, Veterinary Immunology and Immunopathology 107 (2005)
15 27-39). This paper explicitly mentions that both IL-1 and TNF were reported to promote OA but that it is still open whether the abrogation of these cytokines is suitable to treat OA. Wildbaum (Immunity, Vol. 19, 679-688, November, 2003) even reports that neutralizing TNF- α suppresses the inflammatory disease rheumatoid arthritis but not osteoarthritis. Thus, the skilled practitioner would not unambiguously arrive at a IL-1 β
20 and optional TNF- α suppression when searching for a treatment for OA. Moreover, it is explicitly known from the prior art that where in situ treatment with a cytokine antagonists might help against OA, a systemic approach is unsuccessful (see EP 1 715 891; example 3). This is in line with the general understanding that the joints are fairly difficult to reach because of the blood-joint barrier (Bas et al., British Journal of
25 Rheumatology, 1996; 35(6): 548-552 and Kushner et al., Arthritis Rheum, 1971; 14(5): 560-570).

It is also noted that many references are known that pertain to the treatment of acute inflammatory diseases, wherein it has been shown that the diseases can be treated by
30 using a vaccine that comprises IL-1 and/or TNF- α to elicit an immune response against self IL-1 and/or TNF- α . Typical example of such a reference is WO 2007/039552, assigned to Cytos Biotechnology AG, Switzerland. In inflammation, as opposed to a disease such as OA, the role of cytokines is very clear: down regulation provides relief and is thus effective for treatment. In the said references it is often suggested or even
35 stated, without disclosing proof in the form of examples, that the same treatment should also be effective in osteoarthritis because it is known that IL-1 β and TNF- α may play a

role in this disease. However, as explained here-above, OA is a non-inflammatory disease and therefore completely different from inflammatory diseases. The role of cytokines such as IL-1 β and/or TNF- α is not yet clear and even seems to be ambiguous. Therefore, for the practitioner skilled in the field of Osteoarthritis, such references
 5 provide no justified base for even an expectation of a reasonable chance of success by treating OA using immunogenic IL-1 β and/or TNF- α , let alone to expect that a immunogenic IL1 β and optionally immunogenic TNF- α , given systemically, provides an adequate treatment of OA.

10 In short, there are two important reasons why the skilled man, based on the available knowledge about osteoarthritis, would refrain from developing a vaccine against IL-1 β and optionally TNF- α to treat OA: Firstly, the prior art does not unambiguously teach what the role of cytokines, in particular IL-1 β and TNF- α , in OA is and secondly, a systemic approach using a cytokine antagonist to regulate the role of cytokines in the
 15 joint itself has proven to be unsuccessful, even when in-situ treatment based on the same antagonist was proven to be successful. The skilled person therefore, based on the knowledge as is available today, would refrain from developing a vaccine against self-cytokines IL-1 β and/or TNF- α to treat OA, even more so since this means that there will be a systemic attack against these cytokines which could be highly
 20 disadvantageous. Interleukin-1 for example is known to be involved in the immune response against microbial infection, to increase the number of bone marrow cells, to play a critical role in (oral) wound healing, to have antidiabetic effects and even to modulate cellular events during the late stages of pregnancy. A blockade of this cytokine is therefore commonly regarded undesirable.

25 In an embodiment, the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof are homologous with respect to the treated vertebrate. Homologous in this sense means derived from the same species, as opposed to heterologous as defined here-above. Contrary to what one would expect, it has been found that antigen cytokines derived
 30 from the same species induce higher antibody titers in the treated vertebrate.

In another embodiment the part that is non-self with respect to the vertebrate comprises an antigenic determinant derived from a microorganism. A micro-organism in this sense means an organism of microscopic or submicroscopic size, in particular belonging to the
 35 bacteria, yeasts, molds, protozoa, algae, rickettsia, microbes or viruses. It appears that by including such an antigenic determinant, i.e. an epitope that provides an

immunologically active region that binds to antigen-specific membrane receptors on lymphocytes or to secreted antibodies, high antibody titers can be provided against the self cytokines of the vertebrate.

- 5 In yet another embodiment, the part that is non-self with respect to the vertebrate comprises an adjuvant. As stated here-above, an adjuvant can in principle be any non-specific immunostimulating agent. The adjuvant part may be associated with the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof by any chemical or physical bond, or in any other way as long as the adjuvant part is in operative connection with the IL-1 β and
- 10 TNF- α cytokines or derivatives thereof, i.e. as long as the adjuvant part is able to stimulate an immune response against these IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof, and thus also against corresponding antigenic determinants of the self IL-1 β and TNF- α of the vertebrate. Adjuvants in general can be classified according to the immunological events they induce. The first class, comprising i.a. ISCOM's
- 15 (immunostimulating complexes), saponins (or fractions and derivatives thereof such as Quil A), aluminum hydroxide, liposomes, cochleates, polylactic/glycolic acid, facilitates the antigen uptake, transport and presentation by APC's (antigen presenting cells). The second class, comprising i.a. oil emulsions, gels, polymer microspheres, non-ionic block copolymers and most probably also aluminum hydroxide, provide for a depot effect. The
- 20 third class, comprising i.a. CpG-rich motifs, monophosphoryl lipid A, mycobacteria (muramyl dipeptide), yeast extracts, cholera toxin, is based on the recognition of conserved microbial structures, so called pathogen associated microbial patterns (PAMPs), defined as signal 0. The fourth class, comprising i.a. oil emulsion surface active agents, aluminum hydroxide, hypoxia, is based on stimulating the distinguishing
- 25 capacity of the immune system between dangerous and harmless (which need not be the same as self and non-self). The fifth class, comprising i.a. cytokines, is based on upregulation of costimulatory molecules, signal 2, on APCs. An adjuvant helps in providing an adequate immune response. Therefore, it is less crucial that the non-self part of the cytokines or derivatives thereof is already capable of breaking autotolerance.
- 30 An adjuvant therefore provides more freedom in the choice of antigens. In particular with adjuvants from class 1, embodied for example with saponins, fractions thereof and oil in water emulsions (e.g. liposomes), good results have been obtained.

In still another embodiment the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof have a

35 bioactivity that is reduced when compared with the self IL-1 β and TNF- α cytokines of the vertebrate. A reduced bioactivity, i.e. a reduced effect of the agent upon the living

animal or on its tissue, reduces the risk of acute side-effects upon administration of the vaccine. When the bioactivity of the cytokines is not reduced, acute side effects such as vomiting, shock, colic, etc. might occur. Reduction of bioactivity may be obtained by various cytokine-inactivation procedures such as the chemical formaldehyde treatment
5 similar to that used for converting bacterial toxins into toxoids. Such methods are commonly known in the art of vaccine technology. In an alternative approach, mutant cytokines with a reduced bioactivity can be made. This is also commonly known in the art. It is noted that cytokines with a reduced bioactivity are also referred to as being bioinactive (although there might be substantial bioactivity left).

10

The invention also pertains to the use of IL-1 β and optionally TNF- α cytokines to produce a vaccine for the treatment of osteoarthritis in a vertebrate and the treatment itself. The vaccine can be administered by any conventional route used in the art of vaccine technology, in particular by the intramuscular route, the sub-cutaneous, intra-
15 dermal or sub-mucosal route or by the intravenous route, for example in the form of an injectable suspension. The administration can take place as a single dose or as a dose repeated one or more times after a certain interval. The suitable dose may vary *inter alia* as a function of the weight of the individual treated.

20 The invention will be explained in more detail by reference to the following examples.

1. MATERIALS AND METHODS

25

A. Induction of antibodies against self IL-1 β and TNF- α in dogs.

Recombinant canine (Ca) and equine (Eq) proteins. CaIL-1 β , CaTNF- α , EqIL-1 β and
30 EqTNF- α were cloned using standard Molecular Biological techniques using isolated RNA from peripheral blood lymphocytes (PBLs) extracted from dog or horse blood, respectively. The 3'-end of the Ca molecules were genetically fused to the minimal (17 aa) T-cell epitope from the Canine Distemper Virus fusion protein (CDV-F) (Ghosh *et al.* (2001) *Immunology* **104** pp. 58-66). The cDNA fragments encoding IL-1 β and TNF- α
35 were finally ligated in to a pET-vector such that the 5'-end was in-frame with a His-tag (for purification purposes). Equine IL-1 β and TNF- α were not CDV-tagged. All proteins

were expressed by *E. coli*, His-tag purified and checked for LPS content. The proteins used as antigens all had an LPS content < 20 U/ml. SEQ ID 1 represents the DNA for the minimal CDV-F tagged Ca IL-1 β . Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the CDV F-epitope (17 amino acids + stop codon). SEQ ID 2 represents the minimal CDV-F tagged Ca IL-1 β protein itself. SEQ ID 3 represents the DNA for the minimal CDV-F tagged Ca TNF α . Nucleotides 1-63 represent the His-tag, nucleotides 535-588 represent the CDV F-epitope (17 amino acids + stop codon). SEQ ID 4 represents the minimal CDV-F tagged Ca TNF α protein itself. SEQ ID 5 represents the DNA for the Equine IL-1 β . Nucleotides 1-63 represent the His-tag. SEQ ID 6 represents the Equine IL-1 β protein itself. SEQ ID 7 represents the DNA for the Equine TNF α . Nucleotides 1-63 represent the His-tag. SEQ ID 8 represents the Equine TNF α protein itself.

Next to these wildtype molecules as referred to in the paragraph above, a series of bio-inactive mutant (mt) molecules, to circumvent possible systemic adverse reactions, were generated using site-directed mutagenesis (note, in this specification bioactive, wildtype molecules are referred to or indicated as "wt"; bio-inactive, or bio-"less"-active mutant molecules are referred to or indicated as "mt"; when no referral or indication is given, the wild-type form is meant). These mutants were genetically fused at the 3'-end to the minimal (17 aa) or maximal (32 aa) T-cell epitope from the Canine Distemper Virus fusion protein (CDV-F) (Ghosh *et al.* (2001) *Immunology* **104** pp. 58-66), and at the 5'-end (after the His-tag) to the maximal (35 aa) T-cell epitope from the Canine Parvo Virus (CPV) (Rimmelzwaan *et al.* (1990) *J. Gen. Virology* **71** pp. 2321-2329). Mutation sites were chosen based upon available scientific literature about human IL-1 β and TNF- α : Simon *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268** pp.9771-9779 and Evans *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270** pp. 11477-11483 for IL-1 β point mutations, and Zhang *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267** pp. 24069-24075 for TNF- α point mutations. One TNF- α mutant (mutant No 12, see below) is a derivative of specific point mutations combined with spontaneous mutations. All proteins were expressed by *E. coli*, His-tag purified and checked for LPS content. The tested proteins used as antigens all had an LPS content < 20 U/ml. Eighteen bio-inactive mutants were made. The DNA that encodes for these mutants is listed below.

Mutant No 1 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged H30G CaIL-1 β mutant. Nucleotides 1-75 of this DNA represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the

2 f

minimal CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 163C>G and 164A>G represent the H30G mutation.

Mutant No 2 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged K92G CaIL-1 β mutant. Nucleotides 1-72 represent the His-tag, nucleotides 529-582 represent the minimal
5 CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 346A>G and 347A>G represent the K92G mutation.

Mutant No 3 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged H30G plus K92G CaIL-1 β double mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the minimal CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides
10 163C>G and 164A>G represent the H30G mutation, nucleotides 349A>G and 350A>G represent the K92G mutation.

Mutant No 4 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged C7S CaIL-1 β mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the minimal
15 CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 98G>C represent the C7S mutation.

Mutant No 5 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged K8E Ca IL-1 β mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the minimal
CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 100A>G and 102G>A represent the K8E mutation.

20 Mutant No 6 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged L9S CaIL-1 β mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the minimal
CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 104T>C represent the L9S mutation.

Mutant No 7 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged C7S plus K8E plus
25 L9S Ca IL-1 β triple mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 532-585 represent the minimal CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides
98G>C represent the C7S mutation, nucleotides 100A>G and 102G>A represent the
K8E mutation, nucleotides 104T>C represent the L9S mutation.

Mutant No 8 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged C7S CaIL-
30 1 β mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 76-171 represent the
maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 628-726 represent the maximal
CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 194G>C represent the C7S
mutation.

Mutant No 9 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged K8E CaIL-
35 1 β mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 76-171 represents the
maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 628-726 represent the maximal

CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 196A>G and 198G>A represent the K8E mutation.

Mutant No 10 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged L9S CaLL-1 β mutant. Nucleotides 1-75 represent the His-tag, nucleotides 76-171 represent the
5 maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 628-726 represent the maximal CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 200T>C represent the L9S mutation.

Mutant No 11 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged C7S plus K8E plus L9S CaLL-1 β triple mutant. Nucleotides 1-76 represent the His-tag, nucleotides
10 76-171 represent the maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 628-726 represent the maximal CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 194G>C represent the C7S mutation, nucleotides 196A>G and 198G>A represent the K8E mutation, nucleotides 200T>C represent the L9S mutation.

Mutant No 12 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged K8D plus
15 L9S plus Q10del CaLL-1 β triple mutant. Nucleotides 1-76 represent the His-tag, nucleotides 76-171 represent the maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 625-723 represent the maximal CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 196A>G and 198G>T represent the K8D mutation, nucleotides 200T>C represent the L9S mutation, compared to the wildtype sequence amino acid 10 was
20 deleted (Q10del).

Mutant No 13 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged Y87S CaTNF- α mutant. Nucleotides 1-63 represent the His-tag, nucleotides 535-588 represent the minimal CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 323A>C represent the Y87S mutation.

25 Mutant No 14 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged Y119N CaTNF- α mutant. Nucleotides 1-63 represents the His-tag, nucleotides 535-588 represents the minimal CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 418T>A represent the Y119N mutation.

Mutant No 15 is encoded by the DNA for a minimal CDV-F tagged Y87S plus Y119N
30 Ca TNF- α double mutant. Nucleotides 1-63 represents the His-tag, nucleotides 535-588 represent the minimal CDV-F epitope (17 amino acids + stop codon), nucleotides 323A>C represent the Y87S mutation, nucleotides 418T>A represent the Y119N mutation.

Mutant No 16 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged Y87S
35 CaTNF- α mutant. Nucleotides 1-63 represent the His-tag, nucleotides 64-159 represent the maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 631-729 represent the maximal

CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 419A>C represent the Y87S mutation.

Mutant No 17 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged Y119N CaTNF- α mutant. Nucleotides 1-63 represent the His-tag, nucleotides 64-159 represent
5 the maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 631-726 represent the maximal CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 514T>A represent the Y119N mutation.

Mutant No 18 is encoded by the DNA for a maximal CPV and CDV-F tagged Y87S plus Y119N CaTNF- α double mutant. Nucleotides 1-63 represent the His-tag, nucleotides
10 64-159 represent the maximal CPV epitope (32 amino acids), nucleotides 631-726 represent the maximal CDV-F epitope (32 amino acids + stop codon), nucleotides 419A>C represent the Y87S mutation, nucleotides 514T>A represent the Y119N mutation.

15

Vaccine adjuvants. Used adjuvants are QuilA (250 μ g/ml in 0.01M phosphate buffered saline, abbreviated as PBS, also called "saline"), Matrix C (125 μ g/ml in 0.01M PBS) and Microsol (25% Oil-in-Water emulsion). QuilA is a well-known saponin adjuvant isolated from the bark of the South American tree Quillaja saponaria Molina (Rosaceae
20 family). It can be obtained from Biolang, KalveHave, Denmark or Roth, Karlsruhe, Germany. Matrix C (immunostimulating complex or ISCOM) is a vaccine adjuvant containing saponin, cholesterol and phospholipid (phosphatidylcholine), which forms cage-like structures typically 40 nm in diameter. It can be obtained from CSL, Melbourne, Australia or Isconova, Uppsala, Sweden. Microsol is an oil-in-water
25 emulsion consisting of small (typically below 1 μ m) mineral oil droplets (Marcol 52 of ExxonMobil) in water, stabilized by using 1% Tween 80 detergent (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate), available from Acros Organics.

30 **Experimental design.**

For the bioactive (wt) cytokines "only" experiments, the design is as follows. Five groups of approx. 4 month-old conventional beagle dogs were vaccinated s.c. in the right flank with 1.0 ml of the formulations as indicated in Table 1.

35

Table 1. Set up of the experimental vaccination in dogs.

	N	Antigen	adjuvant
1	4	--	none: PBS
2	5	50 µg Ca-N-His-IL-1β-CDV + 5 µg Ca-N-His-TNF-α-CDV	QuilA
3	5	50 µg Ca-N-His-IL-1β-CDV + 5 µg Ca-N-His-TNF-α-CDV	Matrix C
4	5	50 µg Ca-N-His-IL-1β-CDV + 5 µg Ca-N-His-TNF-α-CDV	Microsol
5	5	50 µg Eq-N-His-IL-1β + 5 µg Eq-N-His-TNF-α	QuilA or PBS

At 4, 8, 20 and 24 weeks after the first vaccination dogs received a booster vaccination of 1.0 ml (s.c. in the right flank). Bloodsamples were taken at T=0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 and 36 weeks after the first vaccination. Sera were used (1) to determine the antibody levels against CaIL-1β and CaTNF-α using antigen specific ELISAs; (2) for Western blot analysis; and (3) to check for neutralizing antibodies.

For the mixed bioactive (wt)/bioinactive (mt) cytokines experiments, the design is as follows. Six groups of 15-18 weeks-old conventional Beagle dogs were vaccinated s.c. in the right flank with 1.0 ml of the formulations as indicated in Table 1A. In this experiment 1 mutant CaIL-1β protein (mutant No 4: minimal CDV-F tagged C7S CaIL-1β mutant) and 1 mutant CaTNF-α protein (mutant No. 13: minimal CDV-F tagged Y87S Ca TNF-α mutant) were tested as single protein-antigen or in combination.

Table 1A. Set up of the experimental vaccination in dogs.

	N	Antigen	adjuvant	i.a. NaCl or urate injection
1	4	--	none: PBS	NaCl
2	4	--	None: PBS	Urate
3	4	50 µg wt Ca-N-His-IL-1β-CDV-Fmin	Microsol	Urate
4	4	50 µg wt Ca-N-His-IL-1β-CDV-Fmin 5 µg wt Ca-N-His-TNF-α-CDV-Fmin	Microsol	Urate
5	4	50 µg mt Ca-N-His-IL-1β-C7S-CDV-Fmin	Microsol	Urate
6	4	50 µg mt Ca-N-His-IL-1β-C7S-CDV-Fmin 5 µg mt Ca-N-His-TNF-α-Y87S-CDV-Fmin	Microsol	Urate
N-His = N-terminal His-tag; wt = wildtype; mt = mutant; min = minimal; i.a. = intra-articular				

At 4, 8, 11, 14 and 16 weeks after the first vaccination dogs received a booster vaccination of 1.0 ml (s.c. in the right flank). Bloodsamples were taken at T=0, 4, 8, 11, 14, 16 and 17 weeks after the first vaccination. Sera were used to determine the antibody levels against CaIL-1 β and CaTNF- α using antigen specific ELISAs (sandwich-catching approach).

5

ELISA and Western blot analysis. ELISA analyses were performed using standard procedures. For this, a catching polyclonal goat-anti-canine IL-1 β and a catching monoclonal mouse-anti-canine TNF- α antibody were used to coat 96-well microtiter plates. C-terminally His (C-His)-tagged CaIL-1 β or C-His-tagged CaTNF- α were than added to the plates subsequently followed by dilution series of dog sera. Binding of anti-IL-1 β or anti-TNF- α specific antibodies were detected using a polyclonal rabbit-anti-canine IgG (H+L) HRP-labeled antibody.

10

Inhibition of IL-1 β and TNF- α bioassay. An IL-1 β and TNF- α responsive NIH-3T3 NF κ B luciferase reporter cell line was used to measure inhibition. Pooled dog sera from several time points were pre-incubated with 10 ng/ml of Ca and Eq IL-1 β and TNF- α proteins and tested for neutralizing, i.e. inhibition of receptor-binding, activity. Inhibition of IL-1 β or TNF- α activity by antibodies was quantitated in Relative Light Units (RLU).

20

B. Set up of a urate crystal-induced OA model in Beagle dogs

Experimental design. We used the urate crystals induced osteoarthritis model (see i.a. Bonneau et al; Revue Méd. Vét., 2005, **156**, 4, 179 – 181). Two groups of 4 conventional beagle dogs (approx. 5 months-old) were intra-articularly injected into 1 knee joint (hind leg) with either 1.0 ml 0.9% NaCl (control group) or with 1.0 ml of 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl (OA model group). The intra-articular injections of 1.0 ml solution was performed under general anaesthesia. At T = 0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h and 96h post-injection general behavior, lameness (scored at standing and walking), pain at palpation and knee joint effusion (swelling) were scored for each individual dog. At the end of the experiment the dogs were euthanized and the knees were macroscopically examined in the presence of a pathologist.

25

30

Urate crystals. A 10 mg/ml urate crystals (Sigma itemnr. U2875; batchnr. 120K5305) in 0.9% NaCl solution was used for intra-articular injection. For this, 22 g of urate crystals solution in 0.9% NaCl with a concentration of 50 mg/g was made. This solution was sonified until a suspension was obtained with particles $\leq 50 \mu\text{m}$ (microscopic examination).
5 After the microscopic image confirmed that the particles had a size of $\leq 50 \mu\text{m}$, 20 g suspension was diluted to 100 g with 0.9% NaCl (final concentration 10 mg/ml). The pH was adjusted to pH 7.0 and the suspension was autoclaved. The microscopic image of the suspension was also checked for crystal size (should be $\leq 50 \mu\text{m}$) shortly before and after autoclaving. After preparation the suspension was stored at 2-8°C until further use.

10

Identification. Dogs were numbered (tattooed) individually in the ear.

Housing. The dogs were housed individually in regular kennels under natural non-restricted circumstances, had outdoor exercise possibilities, and received water ad
15 libitum. Crumbs were available to a limited extend.

Table 2. Grouping and dosing.

gr.	N	test article
1	4	1.0 ml 0.9% NaCl
2	4	1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl

20

Injection of 0.9% NaCl. The 4 animals from group 1 (control group) were intra-articularly injected with 1.0 ml 0.9% NaCl under general anesthesia into 1 knee joint (shaved left hind leg).

25 **Injection of urate crystals.** The 4 animals from group 2 (OA model group) were intra-articularly injected with 1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl under general aneesthesia into 1 knee joint (shaved left hind leg).

30

Experimental procedures and parameters.

Observation. At T =0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h and 96h post-injection
general behavior, lameness (scored at standing and walking), pain at palpation and
5 knee joint effusion (swelling) were scored for each individual dog. Dogs were first
observed and scored in their cages, subsequently during walking and finally at standing
on an observation table.

Lameness scoring:

10

Standing score

- 0: Stands normally with full weight-bearing.
- 1: Abnormal position with partial weight-bearing.
- 2: Abnormal position with non weight-bearing (3 legged dog).
- 15 3: Reluctant to rise.

Walking score

- 0: Walks normally with full weight-bearing.
- 1: Slight lameness with partial weight-bearing.
- 20 2: Obvious lameness with intermittent partial weight-bearing.
- 3: Non weight-bearing (3 legged dog).
- 4: Reluctant to walk.

Trotting score

- 25 0: Trots normally with full weight-bearing.
- 1: Slight lameness with partial weight-bearing.
- 2: Obvious lameness with intermittent partial weight-bearing.
- 3: Non weight-bearing (3 legged dog).
- 4: Reluctant to trot.

30 **Pain at palpation score:**

- 0: No signs of pain.
- 1: Mild to moderate pain (allows palpation but turning head or pulling away, vocalization,
depressed).
- 35 2: Severe pain (does not allow examiner to palpate the joint).

Knee joint effusion (swelling) in comparison to the non-injected joint score:

- 0: No joint effusion (distinct patellar ligament palpable).
- 5 1: Mild effusion (minimal synovial filling with perceptible ligament).
- 2: Moderate effusion (obvious synovial filling with indistinct ligament).
- 3: Severe effusion (no ligament palpable).

10

C. Set up of a urate crystal-induced OA model in Shetland ponies

Experimental design. We used the same osteoarthritis model in ponies. Two groups of 2
15 conventional Shetland ponies (approx. 12 months-old) were intra-articularly injected into 1
knee joint (right hind leg) with either 5.0 ml 0.9% NaCl (control group) or with 5.0 ml of 10
mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl (OA model group). The intra-articular injections of 5.0 ml
solution was performed under light sedation. At T = 0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h,
72h and 96h post-injection general behavior, lameness (scored at standing and
20 walking), pain at palpation and knee joint effusion (swelling) were scored for each
individual pony. At the end of the experiment the ponies were euthanized and the knees
were macroscopically examined by a pathologist.

25

Urate crystals. See section B.

30

Identification. The Shetland ponies were identified by an implanted chip and a numbered
neckbelt.

35

Housing. The ponies, housed individually in conventional stable-boxes under natural
non-restricted circumstances, received hay and water ad libitum, crumbs were available
to limited extend.

35

Table 3. Grouping and dosing.

gr.	N	test article
1	2	5.0 ml 0.9% NaCl
2	2	5.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl

5 **Injection of 0.9% NaCl.** The 2 animals from group 1 (control group) were intra-articularly injected with 5.0 ml 0.9% NaCl under light sedation into 1 knee joint (shaved right hind leg).

10 **Injection of urate crystals.** The 2 animals from group 2 (OA model group) were intra-articularly injected with 5.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl under light sedation into 1 knee joint (shaved right hind leg).

Experimental procedures and parameters.

15 **Observation.** At T =0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h and 96h post-injection general behavior, lameness (scored at standing and walking), pain at palpation and knee joint effusion (swelling) were scored for each individual pony.

20 Ponies were observed and scored in their stable-boxes, and subsequently during walking at the corridor.

Lameness scoring:

Standing score

- 0: Stands normally with full weight-bearing.
- 5 1: Abnormal position with partial weight-bearing.
- 2: Abnormal position with non weight-bearing (3 legged pony).
- 3: Reluctant to rise.

Walking score

- 10 0: Walks normally with full weight-bearing.
- 1: Slight lameness with partial weight-bearing.
- 2: Obvious lameness with intermittent partial weight-bearing.
- 3: Non weight-bearing (3 legged pony).
- 4: Reluctant to walk.

15

Pain at palpation score:

- 0: No signs of pain.
- 1: Mild to moderate pain (allows palpation but turning head or pulling away, vocalization,
- 20 depressed).
- 2: Severe pain (does not allow examiner to palpate the joint).

Knee joint effusion (swelling) in comparison to the non-injected joint score:

- 25 0: No joint effusion (distinct patellar ligament palpable).
- 1: Mild effusion (minimal synovial filling with perceptible ligament).
- 2: Moderate effusion (obvious synovial filling with indistinct ligament).
- 3: Severe effusion (no ligament palpable).

30

D. Prevention of OA symptoms in Beagle dogs prophylactically vaccinated against IL-1 β and TNF- α

Experimental vaccination design. In study A, for the “wt-only” experiments dogs were vaccinated at T=0, T=4, T=8, T=20 and T=24 weeks post vaccination with IL-1 β and TNF- α formulated with several distinct immunopotentiators per group (see Table 1). For the present study these dogs were re-vaccinated twice 24 weeks after the last vaccination, *i.e.* at T=48 and T=54 weeks post-primo vaccination with 1.0 ml (s.c. in the right flank) vaccine formulation as indicated in Table 4. Blood samples for serology were taken at T=48, T=54 and T=58 weeks after the first vaccination. Sera were used to determine the antibody levels against IL-1 β and TNF- α using antigen specific ELISAs and standard procedures.

Table 4. Set up of the experimental vaccination in dogs, continued from Table 1

gr.	N	antigen	adjuvant	animal nr.
1	6	--	none: PBS	223 - 381 - 384 - 834 - 892 - 924
2	4	50 μ g Ca-N-His-IL-1 β -CDV 5 μ g Ca-N-His-TNF- α -CDV	QuilA	8757 - 9140 - 8751 - 8759
3	5	50 μ g Ca-N-His-IL-1 β -CDV 5 μ g Ca-N-His-TNF- α -CDV	Microsol	8749 - 9146 - 9126 - 8747 - 8761
4	5	50 μ g Eq-N-His-IL-1 β 5 μ g Eq-N-His-TNF- α	none: PBS	8755 - 9134 - 8763 - 8753 - 9144

For the mixed wt/mt experiments the experimental vaccination as depicted in Table 1A was used.

Induction of OA. For the wt-only experiments, one (1) week after the last blood samples were taken (T=59 weeks) dogs from group 1 (PBS control group) were split into 2 new groups (N=2 and N=4). All dogs from the 5 groups, approx. 18 months-old at this time point, were intra-articularly injected into 1 knee joint (hind leg) with either 1.0 ml 0.9% NaCl (control group 1) or with 1.0 ml of 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl (OA model groups

2-5). The intra-articular injections of 1.0 ml solution were performed under general anaesthesia. At T=1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 32h, 48h, 72h and 96h post-injection general behavior, lameness (scored at standing and walking), pain at palpation and knee joint effusion (swelling) were scored for each individual dog. At the end of the experiment the dogs were euthanized and the knees were macroscopically examined in the presence of a pathologist.

Table 5. Set up up of the induction of OA in the vaccinated dogs.

gr.	N	test article	animal nr.
1	2	1.0 ml 0.9% NaCl	223 - 381 (former group 1 of Table 4)
2	4	1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl	384 - 834 - 892 - 924 (former group 1 of Table 4)
3	4	1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl	8757 - 9140 - 8751 - 8759 (former group 2 of Table 4)
4	5	1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl	8749 - 9146 - 9126 - 8747 - 8761 (former group 3 of Table 4)
5	5	1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl	8755 - 9134 - 8763 - 8753 - 9144 (former group 4 of Table 4)

For the mixed wt/mt experiments, the induction of OA was set up as indicated in Table 1A.

Lameness scoring: see section B.

Statistical analysis. Comparison of mean scoring values was performed using analysis of variance (ANOVA) with least significant difference (L.S.D.) as multiple comparison test. All results were generated using SAS Enterprise Guide 2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) software. Differences were considered significant at a confidence level of 95% ($P<0.05$).

2. RESULTS

A. Induction of antibodies against self IL-1 β and TNF- α in dogs.

5 **Side effects resulting from vaccination (wt-only experiments).** After primary vaccination (primo) local (skin) reactions were visible in dogs receiving the E α proteins in QuilA. In the subsequent booster vaccinations we therefore replaced QuilA by PBS in this vaccination group (see also Table 1). Shortly after the first booster vaccination most of the dogs from groups 2 (Ca proteins in QuilA), 3 (Ca proteins in Matrix-C) and 4 (Ca
10 proteins in Microsol) became ill, possibly because of the presence of a high concentration of (free) bioactive TNF- α in the vaccine formulation. These acute systemic side effects were prevented in subsequent booster vaccinations by reducing the amount of TNF- α , for both Ca and E α proteins, from 50 μ g/dose/dog to 5 μ g/dose/dog.

15 **Side effects resulting from vaccination (mixed wt/mt experiments).** After primary vaccination (primo) local (skin) reactions were visible in most of the dogs receiving the Microsol adjuvant (groups 3-6). After the first and subsequent (booster) vaccinations local reactions were less prominent. No acute systemic side effects were observed at the used CaIL-1 β and CaTNF- α protein concentrations.

20

Antibody titers against IL-1 β and TNF- α (wt-only experiments). As depicted in **Figures 1A-D** significant ELISA antibody titers can be generated against the self-molecules CaIL-1 β and CaTNF- α . It is clear from these figures that the antibodies are cross-reactive, *i.e.* the antibodies raised against the Ca proteins recognize the E α
25 proteins, and vice versa. It is remarkable that the antibodies raised against CaTNF- α recognize E α TNF- α at higher titer (possibly due to affinity/specificity) than the CaTNF- α protein, particularly at the early time points (**Figures 1C and 1D**). In general, higher overall antibody titers were generated in dogs vaccinated with the Ca proteins when compared to the corresponding E α counterparts. Twelve weeks post-primo vaccination groups 1 and 3 were removed from the experiment due to housing limitations. In
30 summary, it can be concluded that by using genetically modified canine self-molecules or heterologous equine proteins, it is possible to break immunological tolerance towards self and to induce high antibody titers. It is noted that with the mutant cytokines comparable results were obtained.

35

Western blot analysis. To confirm the specificity of the anti-IL-1 β and anti-TNF- α antibodies Western blot analysis was performed using CDV-tagged and non-tagged proteins. Western blots were incubated with sera from T=9 weeks post primo-vaccination. As depicted in **Figure 2** all antibodies cross-react with the Ca and Eq IL-1 β and TNF- α proteins. A non-related His-tag purified *E. coli*-expressed protein, chicken IL-18 (ChIL-18), was used as a control and was not recognized by the antibodies.

Neutralizing capacity of anti-IL-1 β and anti-TNF- α antibodies. Although high antibody titers were induced in dogs against IL-1 β and TNF- α , it was not clear whether these antibodies would be able to neutralize the bioactivity of the corresponding proteins. For this we used an IL-1 β and TNF- α responsive NIH-3T3 NF κ B luciferase reporter cell line. Ca and Eq IL-1 β and TNF- α were pre-incubated with pooled sera from several time points and tested for neutralizing, *i.e.* inhibition of receptor binding, activity. From the results depicted in **Figures 3A** and **3B** it can be concluded that pooled sera from 24 weeks post primo-vaccination contain the highest anti-CaIL-1 β and anti-EqIL-1 β neutralizing antibodies. Bioactivity, measured in Relative Light Units (RLU), of CaIL-1 β and EqIL-1 β is dramatically reduced when compared to the other sera. This is also the case, although less prominent, for inhibition of the bioactivity of CaTNF- α en EqTNF- α (**Figure 3C** and **3D**). Pooled sera from 6 weeks and 9 plus 12 weeks post primo-vaccination contain few neutralizing IL-1 β antibodies but significant neutralizing TNF- α antibodies.

Conclusion

In conclusion we have provided clear evidence that we can raise antibodies by active immunization against the minimal CDV-tagged wildtype and mutant CaIL-1 β and CaTNF- α self molecules.

B. Set up of a urate crystal-induced OA model in Beagle dogs

30

Injection of fluid into the knee joint. In general, the injection of 1.0 ml 0.9% NaCl or 1.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl into the knee joint was performed without any serious side effects.

Clinical assessment: scoring of lameness. The animals injected with the urate crystals showed overt lameness, both at walking and standing, within 2 hours after injection (see **Figure 4**). Two dogs recovered fully within 24 hours whereas the other 2 dogs suffered from the urate crystals until the end of the experiment. The results from the macroscopic examination of the knee joints of the euthanized dogs revealed that these 2 dogs had a patella luxation (anatomical joint abnormality). This patella luxation in combination with the injection of the urate crystals solution most probably resulted in the above mentioned prolonged period of discomfort. In the group of dogs injected with 0.9% NaCl solution only 1 dog suffered for a rather short period of time from the injection (visible at T=8hr). Upon macroscopical examination of the knee joint of this dog it became clear that this animal also had a patella luxation.

Clinical assessment: pain at palpation and knee joint effusion (swelling). Pain at palpation and knee joint effusion were also monitored. As can be seen in **Figure 5** the SEMs (standard error of mean) are large indicating that there is quite some variation between individual dogs. Between 2 and 8 hours post injection of urate crystals pain at palpation is measurable with a maximum between 4 and 6 hours. Knee joint effusion is somewhat delayed compared to pain at palpation and starts at 4 hours post injection with a maximum at 8 hours.

Clinical assessment: knee pathology. At the end of the experiment all dogs were euthanized and the knees were examined macroscopically. In all dogs no traces of injection solution were found. Only in 1 dog the injection site was still visible. In the knees of 3 dogs a large amount of fluid was visible. It proved that these 3 dogs had a patella luxation.

Conclusion

The applied arthritis model in dogs by intra-articular injection of a solution containing urate crystals into 1 knee joint (hind leg) is rapid (within 2 hours effects are visible), short-lived (hours to 1-2 days) and reversible. Relevant parameters to monitor the process include scoring of lameness at walking and standing, pain at palpation and joint effusion. Body temperature and knee temperature are no relevant parameters in this model.

C. Set up of a urate crystal-induced OA model in Shetland ponies

Injection of fluid into the knee joint. In general, the injection of 5.0 ml 0.9% NaCl or 5.0 ml 10 mg/ml urate crystals in 0.9% NaCl into the knee joint was performed without any serious side effects.

5 **Clinical assessment: scoring of lameness.** The ponies injected with the urate crystals showed overt lameness, both at walking and standing, within 2 hours after injection (see **Figure 6**). Maximum discomfort was scored between 6 and 8 hours post-injection. The 2 control ponies showed no signs of lameness.

10 **Clinical assessment: pain at palpation and knee joint effusion (swelling).** Pain at palpation and knee joint effusion were also monitored. As can be seen in **Figure 7A** pain was scored within 2 hours post-injection whereas knee joint effusion (**Figure 7B**) was detectable at a later stage (>48 hours). As the knee joint effusion does not increase between 72 and 96 hours, this might indicate that the swelling reaches a maximum at
15 96 hours.

Clinical assessment: knee pathology. At the end of the experiment all ponies were euthanized and the knees were macroscopically examined. In all ponies no traces of injection solution could be found. Macroscopical examination of the knee joints of the
20 ponies injected with urate showed an increased amount of yellow synovial fluid, thickening of the synovial membrane with oedema and haemorrhage. The controls showed a no pathology.

Conclusion

25 The applied arthritis model in ponies by intra-articular injection of a solution containing urate crystals into 1 knee joint (right hind leg) is, as we also showed in dogs, rapid (within 2 hours effects are visible), short-lived (hours to 1-2 days) and reversible when scoring lameness and pain. Knee joint effusion (swelling) is palpable starting at 48 hours post-injection and appears to reach a maximum between 72 and 96 hours.

30

D. Prevention of OA symptoms in Beagle dogs prophylactically vaccinated against IL-1 β and TNF- α

35 **Antibody titers against IL-1 β and TNF- α after re-vaccination.** As depicted in **Figures 8A-D** (wt-only experiments) the overall antibody titers at T=48 weeks post-vaccination,

i.e. 24 weeks post-last booster vaccination, were maintained at a rather high level. Re-vaccination of the dogs resulted in a moderate increase in antibody titer across all tested antigens and all groups.

5 **Clinical assessment: discomfort score.** In Figure 9 (wt-only experiments) the discomfort scores for 'standing' (Figure 9B), 'walking' (Figure 9C), 'pain at palpation' (Figure 9D), 'knee joint effusion (swelling)' (Figure 9E) and the 'total clinical score', which is the average of all discomfort scores measured, (Figure 9A) are depicted. From all figures it is clear that non-vaccinated dogs showed overt discomfort within 2 hours
10 after injection. The vaccinated dogs, showed, in several cases significantly, reduced or moderate to mild discomfort. As can be seen in the figures the discomfort scores for the vaccinated dogs were significantly lower and showed a delay when compared to the non-vaccinated dogs.

15 **Clinical assessment: knee pathology.** At the end of the experiment all dogs were euthanized and the knees were macroscopically examined by a pathologist. In general, except for the NaCl control dogs, in all dogs the synovial membrane appeared to be thickened and reddish. Next to this in all knees a small amount of mucous fluid was detected.

20 **Clinical assessment: discomfort score.** In Figure 10 (mixed wt/mt experiments) the discomfort scores for 'standing' (Figure 10A) and 'walking' (Figure 10B) are depicted at the time points 6 hours and 8 hours post intra-articular urate injection. From both figures it is clear that non-vaccinated dogs (urate control group) showed overt discomfort at 6
25 hours and 8 hours after injection. The vaccinated dogs, showed, in several cases significantly, reduced or moderate to mild discomfort. As can be seen in Figure 10 the discomfort scores for the vaccinated dogs were significantly lower when compared to the non-vaccinated dogs (urate control group). Also clear at, especially, 8 hours post-injection is that vaccination with only wildtype CalL-1 β or only mutant CalL-1 β reduces
30 discomfort when compared to non-vaccinated urate-control dogs.

Conclusion

From the results obtained from this experiment we can conclude that it is possible to induce antibodies against the self-molecules IL-1 β and TNF- α , based on the use of
35 either wildtype or mutant cytokines, and that these antibodies, directed either against IL-1 β alone or also directed against TNF- α , are able to suppress arthritis symptoms. It can

also be concluded that the best results seem to be obtained with a vaccine that is directed against both IL-1 β and TNF- α .

E. Various

5

It is noted that with using bioactive IL-1 β and TNF- α , we have seen acute side effects. These side-effects can be prevented by using bio-inactive versions of these cytokines, for example as known from US patent 6,093,405. One could choose for partially inactivated cytokines to obtain a balance between immunogenicity and bioactivity.

10 We used the urate crystals model for inducing OA. It is noted that other models for OA are known from the prior art, for example the Anterior Cruciate Ligament Transection model (ACLT, described in Fleming et al; Curr Opin Orthop. 2005 October; 16(5): 354 – 362) or the Groove model (described in Mastbergen et al; Rheumatology, 2006; 45(4): 405 – 413). Given the positive results of the experiments as described in the present
15 application, it is believed that corresponding results will be obtained when applying these models or patients suffering from or developing OA due to natural causes. We have shown a significant effect in the relief for OA patients when vaccinated with a combination of IL-1 β and TNF- α or derivatives thereof. This has been shown in beagle dogs. Given the results in this vertebrate, and the resemblance in physiological
20 processes pertaining to joints in the group of vertebrates, in particular mammalian vertebrates such as dogs, horses and humans, the current invention can be used in any vertebrate, in particular mammalian vertebrate.

F. Description of the figures

25

Figure 1 shows IL- β and TNF- α specific antibody responses measured at several time points post-vaccination. Dogs were either not-immunized (saline control), immunized with [CaIL-1 β + CaTNF- α] proteins (abbreviated with Ca) formulated in QuilA, Matrix C, or Microsol, or immunized with [EqIL-1 β + EqTNF- α] proteins
30 (abbreviated with Eq) formulated in QuilA (primo only)/saline (boosters). At 4, 8, 20 and 24 weeks after the primo-vaccination dogs received a booster vaccination. Antibodies were measured using antigen specific ELISAs in which proteins were used without CDV-tag. **[A]**. antibody titers measured against CaIL-1 β ; **[B]**. antibody titers measured against EqIL-1 β ; **[C]**. antibody titers measured against
35 CaTNF- α ; **[D]**. antibody titers measured against EqTNF- α . T= weeks post primo-vaccination.

Figure 2 shows a Western blot analysis of CDV-tagged and un-tagged CalL- β , CaTNF- α , and EqIL-1 β and EqTNF- α proteins. Proteins, 1 μ g/lane, were analyzed by 4-12% Nu-PAGE and Western blotting using the sera from 1 dog from each vaccination group at 9 weeks post primo-vaccination. **[A]**. Coomassie stained gel; **[B]**. Western blot incubated with control serum; **[C]**. Western blot incubated with serum from a dog vaccinated with [CalL-1 β +CaTNF- α] formulated in QuilA adjuvant; **[D]**. Western blot incubated with serum from a dog vaccinated with [CalL-1 β +CaTNF- α] formulated in Matrix C adjuvant; **[E]**. Western blot incubated with serum from a dog vaccinated with [CalL-1 β +CaTNF- α] formulated in Microsol adjuvant; **[F]**. Western blot incubated with serum from a dog vaccinated with [EqIL-1 β +EqTNF- α] formulated in QuilA (primo only)/saline (boosters) adjuvant.

Figure 3 shows the inhibition of IL-1 β - or TNF- α -induced NF κ B activation by sera from vaccinated dogs. Ten ng/ml of **[A]** CalL-1 β , **[B]** EqIL-1 β , **[C]** CaTNF- α , or **[D]** EqTNF- α were mixed with dilutions of antibody sera from dogs vaccinated with [CalL-1 β +CaTNF- α] and incubated with NIH-3T3 reporter cells. Inhibition of IL-1 β or TNF- α activity by antibodies was quantitated in Relative Light Units (RLU). **T = 6 weeks**: this is pooled sera from dogs of groups 2+3+4 (see Table 1) taken 6 weeks post primo-vaccination. **T = 9+12 weeks**: this is pooled sera from dogs of groups 2+3+4 (see Table 1) taken 9 and 12 weeks post primo-vaccination. **T = 24 weeks**: this is pooled sera from dogs of groups 2+4 (see Table 1) taken 24 weeks post primo-vaccination.

25

Figure 4 shows mean scores at standing **[A]** and walking **[B]** and mean total lameness scores **[C]** (standing + walking) for beagle dogs. Data are expressed as geometric mean $\pm$ SEM.

Figure 5 shows mean scores of pain at palpation **[A]** and mean scores of knee joint effusion **[B]** for beagle dogs. Data are expressed as geometric mean $\pm$ SEM.

Figure 6 shows mean scores at standing **[A]** and walking **[B]** and mean total lameness scores **[C]** (standing + walking) for Shetland ponies. Data are expressed

as geometric mean $\pm$ SEM. The arrow at the left vertical axis indicates the maximal score for the indicated parameter.

Figure 7 shows the mean scores for pain at palpation **[A]** and the mean scores for knee joint effusion **[B]**. Figure 7 **[C]** shows the total clinical score (standing + walking + pain + swelling) for Shetland ponies. Data are expressed as geometric mean $\pm$ SEM. The arrow at the left vertical axis indicates the maximal score for the indicated parameter.

Figure 8 shows IL- β and TNF- α specific antibody responses measured at several time points post-primo vaccination. Dogs were either not-vaccinated (saline control) or re-vaccinated at T=48 and T=54 weeks post-primo vaccination with [CDV-tagged CalL-1 β + CaTNF- α] proteins (abbreviated with Ca) formulated in QuilA or Microsol, or re-vaccinated with [EqIL-1 β + EqTNF- α] proteins (abbreviated with Eq) formulated in QuilA (primo only) or saline (boosters). Antibodies were measured at T=48, T=54 and T=58 weeks post-primo vaccination using antigen specific ELISAs in which proteins were used without CDV-tag. **[A]** antibody titers measured against CalL-1 β ; **[B]** antibody titers measured against EqIL-1 β ; **[C]** antibody titers measured against CaTNF- α ; **[D]** antibody titers measured against EqTNF- α . ★ = significantly different ($P < 0.05$) from saline group; $\nabla \nabla$ = significantly different ($P < 0.05$) between indicated groups. T= weeks post primo-vaccination.

Figure 9 shows mean total clinical score for beagle dogs. Figure 9 **[A]** gives the total clinical score (standing + walking + pain at palpation + knee joint swelling). Figure 9 **[B]** gives the mean score at standing. Walking is shown in **[C]** and pain at palpation in **[D]**, knee joint effusion (swelling) in **[E]**. Data are expressed as geometric mean $\pm$ SEM.

★ = significantly different ($P < 0.05$) from urate crystal control group at the indicated time point. $\nabla \nabla$ = significantly different ($P < 0.05$) between indicated groups.

Figure 10 shows mean clinical score for beagle dogs. **[A]**. mean clinical score at standing; **[B]**. mean clinical score at walking. Data are expressed as geometric

mean $\pm$ SEM. ★ = significantly different ($P < 0.05$) from urate crystal control group at the indicated time point.

CLAIMS

1. Vaccine for the treatment of osteoarthritis in a vertebrate comprising IL-1 β and optionally TNF- α cytokines or derivatives thereof, and in association with said IL-1 β and
5 optional TNF- α or derivatives thereof a part that is non-self with respect to the vertebrate such that the vaccine elicits an immune response in the vertebrate against IL-1 β and optionally TNF- α self-molecules of the said vertebrate.
2. Vaccine according to claim 1, wherein the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives
10 thereof are homologous with respect to the treated vertebrate.
3. Vaccine according to claim 1 or 2, wherein the part that is non-self with respect to the vertebrate comprises an antigenic determinant derived from a microorganism.
- 15 4. Vaccine according to any of the preceding claims, wherein the part that is non-self with respect to the vertebrate comprises an adjuvant.
5. Vaccine according to any of the preceding claims, characterized in that the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof have a bioactivity that is reduced when
20 compared with the self IL-1 β and TNF- α cytokines of the vertebrate.
6. Use of IL-1 β and optionally TNF- α cytokines to produce a vaccine for the treatment of osteoarthritis in a vertebrate.
- 25 7. Use according to claim 6, wherein the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof are homologous with respect to the treated vertebrate.
8. Use according to claim 6 or 7, wherein the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof are associated with an antigenic determinant derived from a microorganism to
30 produce the vaccine.
9. Use according to any of the claims 6-8, wherein the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof are associated with an adjuvant to produce the vaccine.
- 35 10. Use according to any of the claims 6 to 8, characterized in that the IL-1 β and TNF- α cytokines or derivatives thereof have a bioactivity that is reduced when compared with

the self IL-1 β and TNF- α cytokines of the vertebrate.

11. Treatment of osteoarthritis in a vertebrate by administering a vaccine according to any of the claims 1 to 5.

5

@

50.

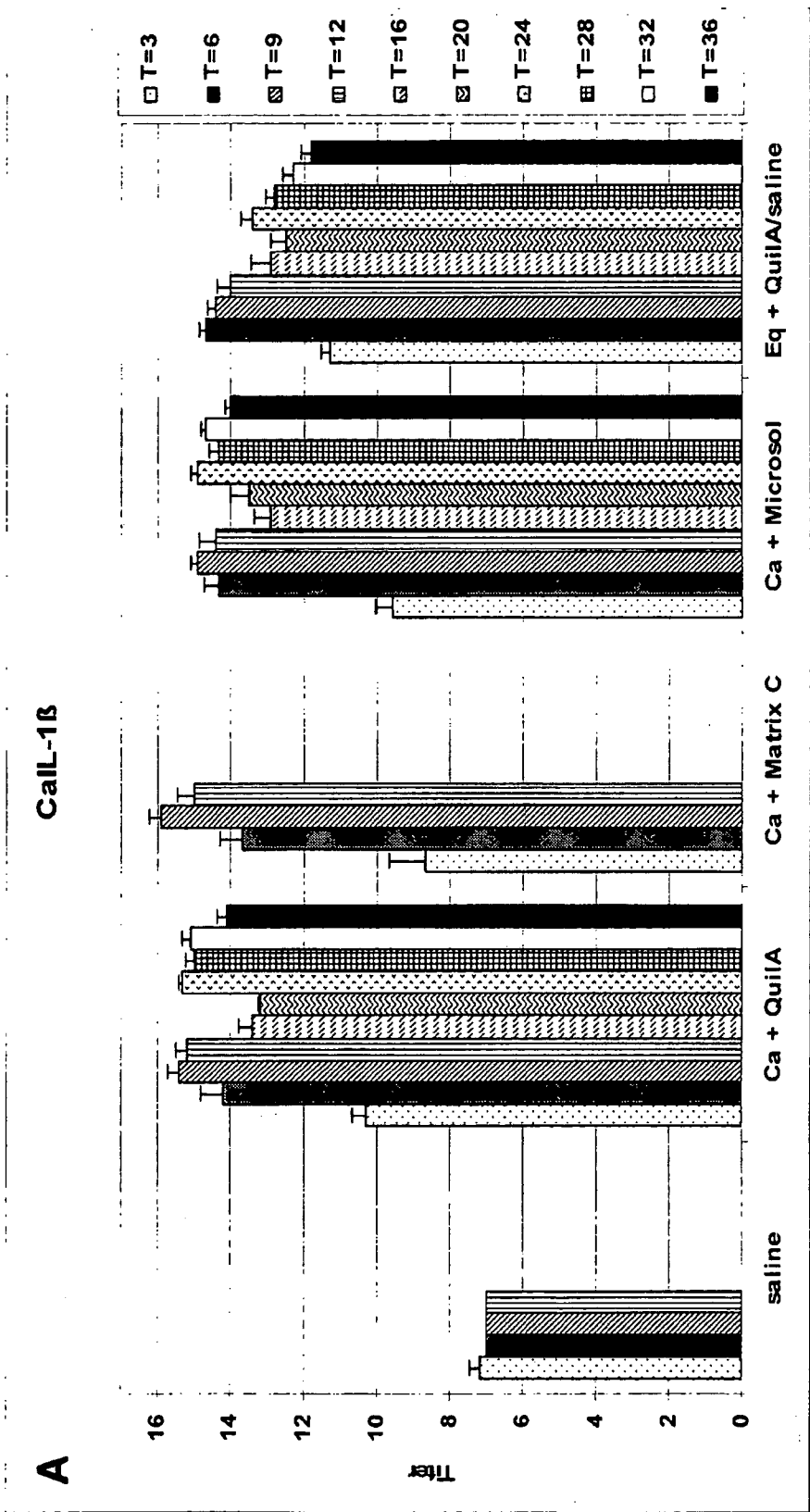


Figure 1

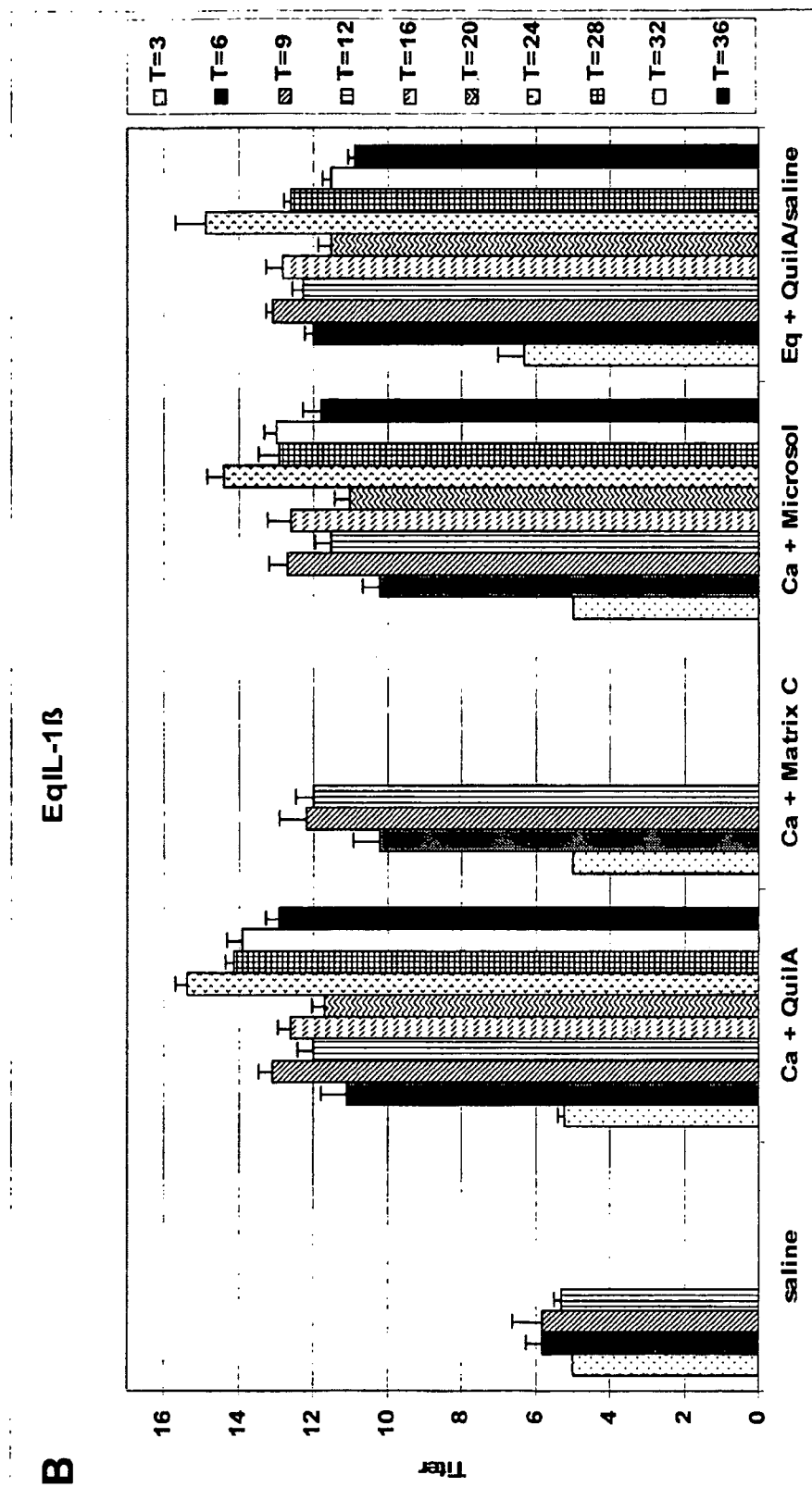


Figure 1 (ctd)

52

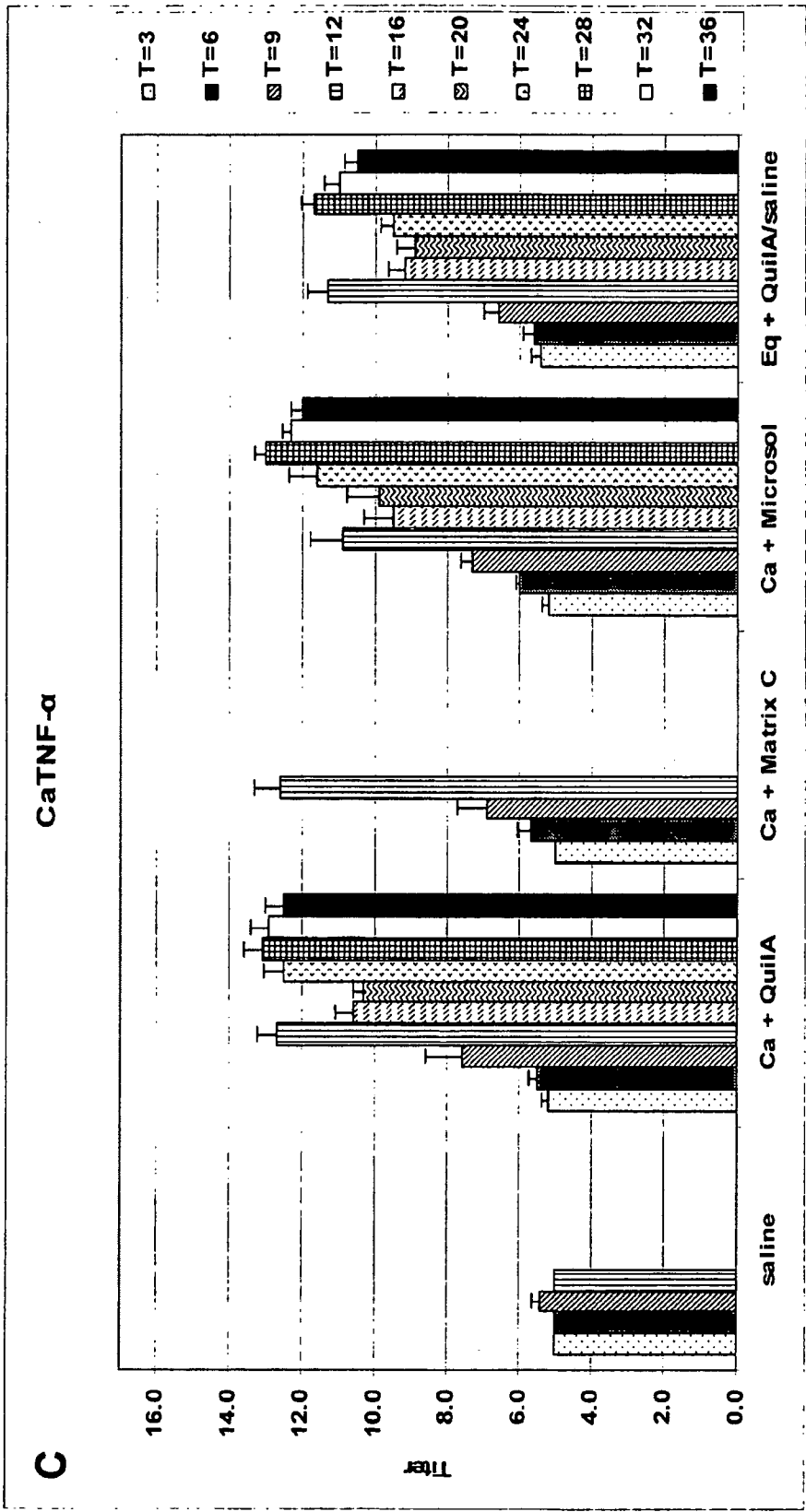


Figure 1 (ctd)

53

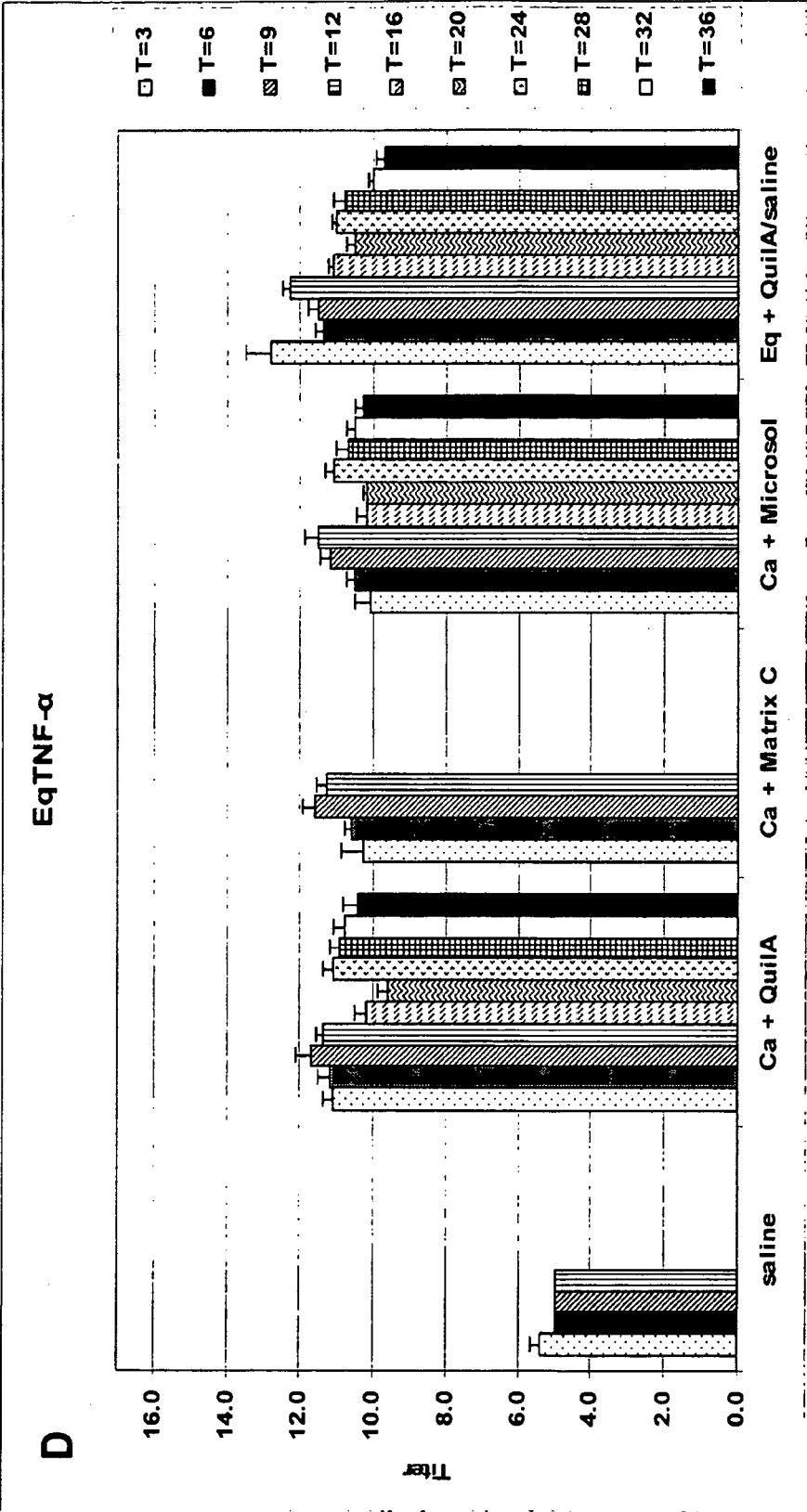


Figure 1 (ctd)

24

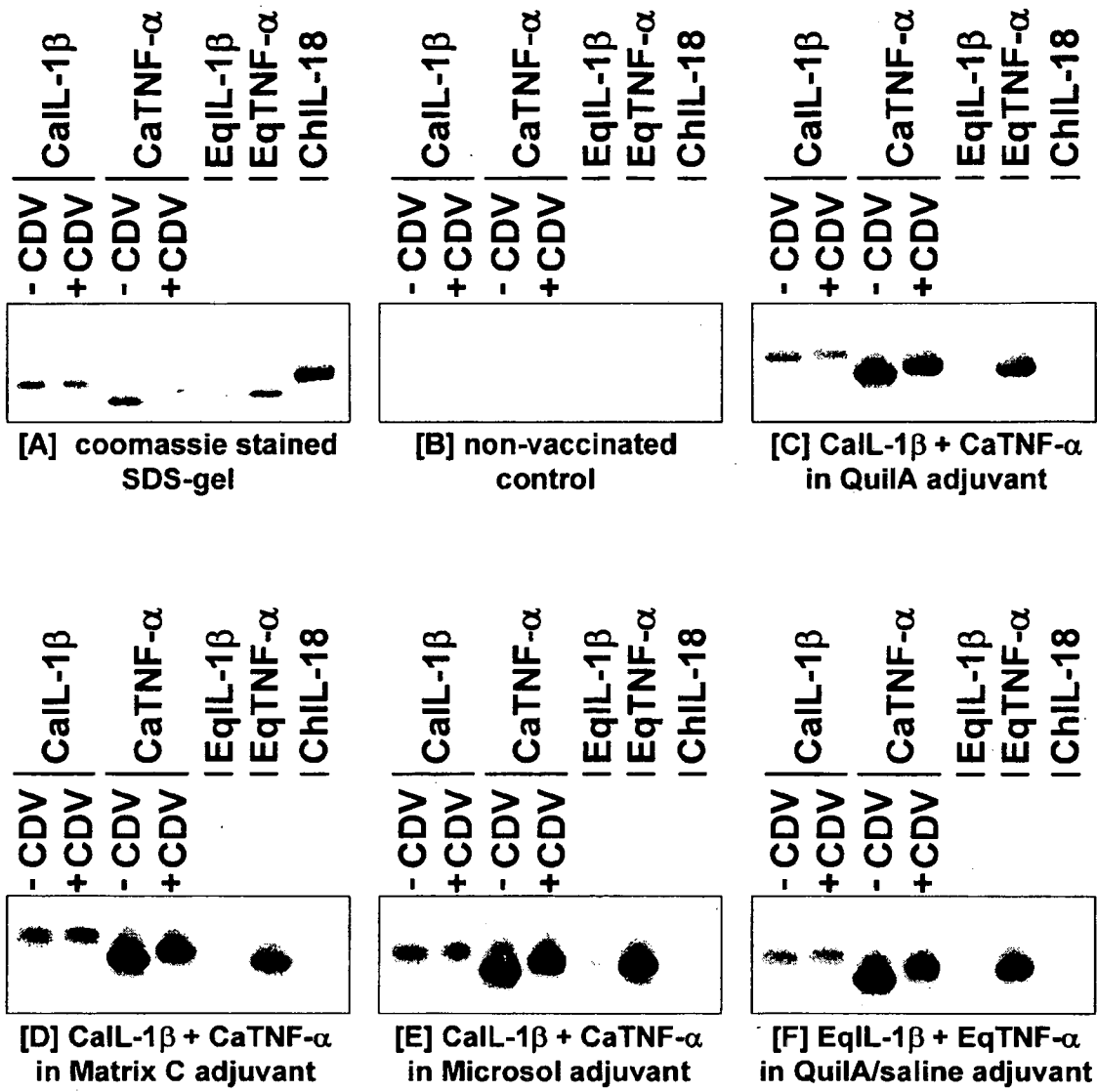


Figure 2

SS

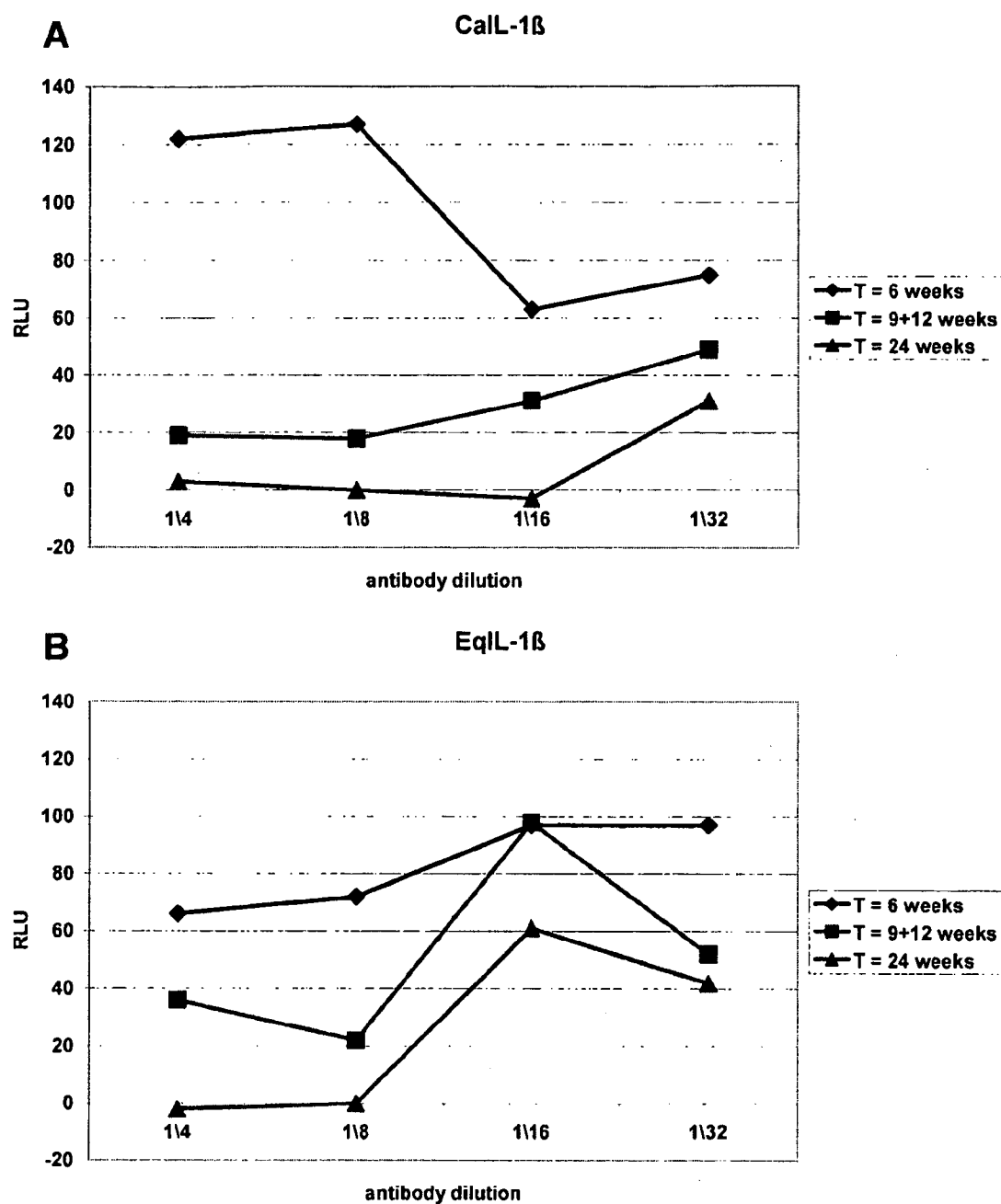


Figure 3

56

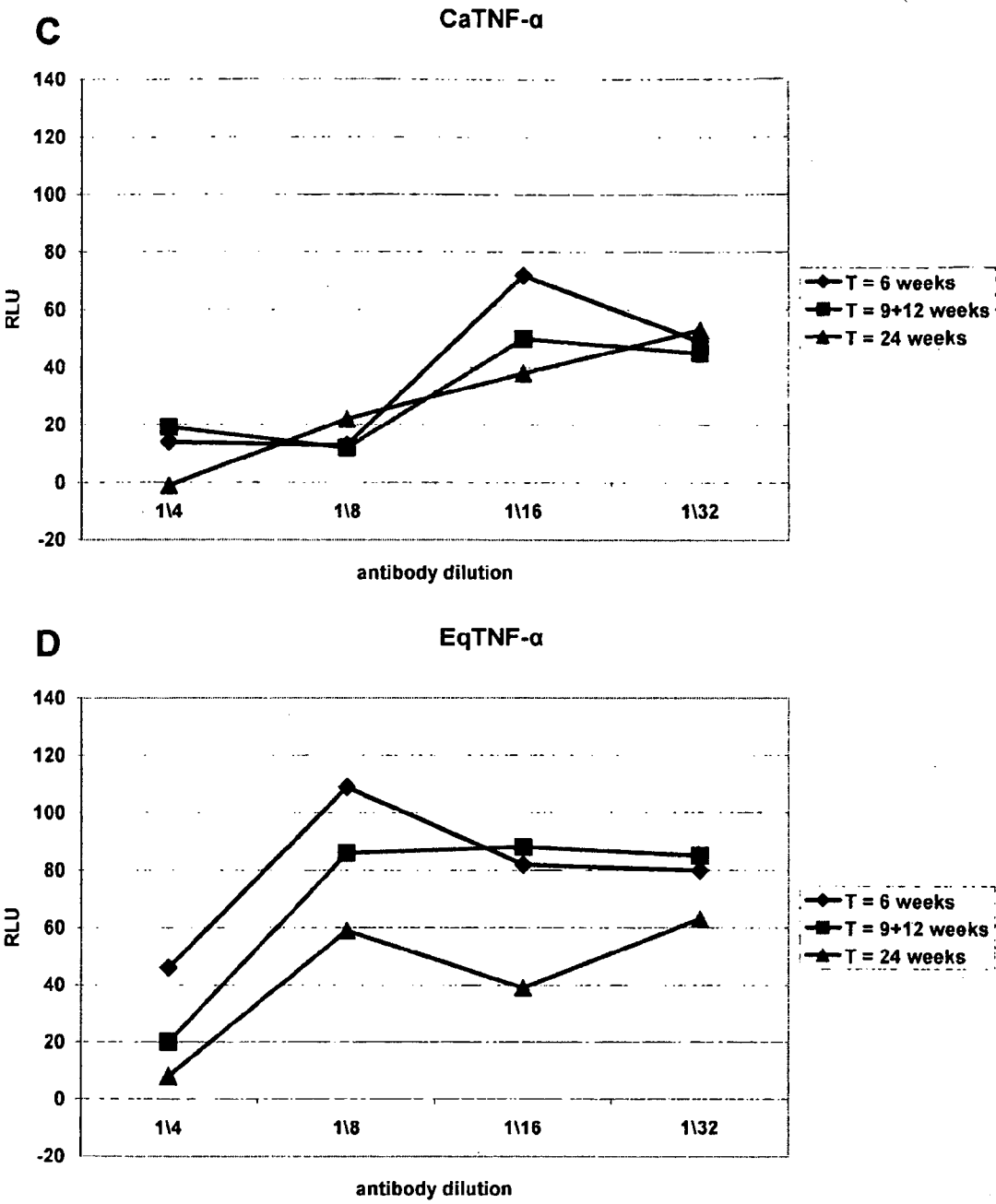


Figure 3 (ctd)

st

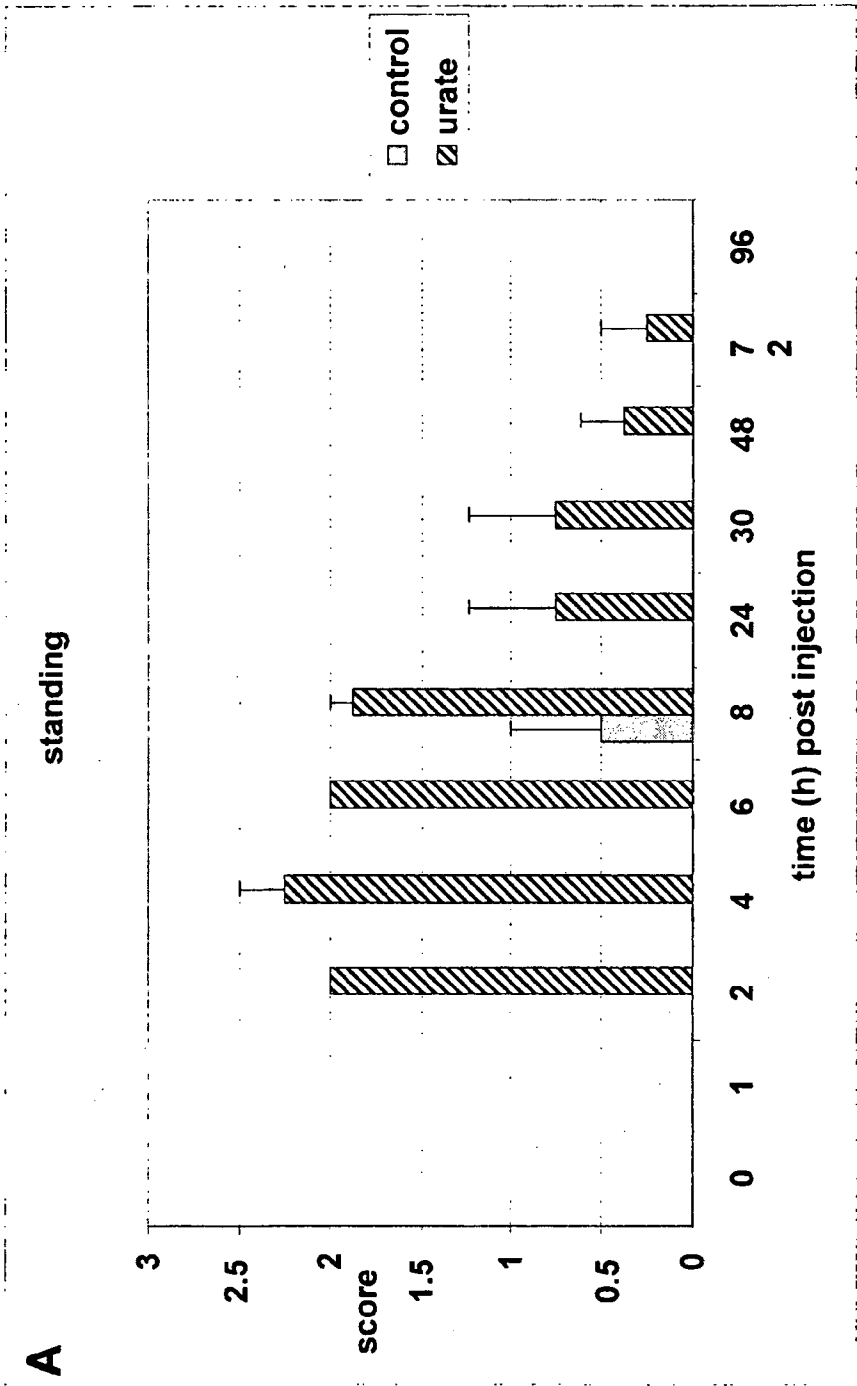


Figure 4

S &

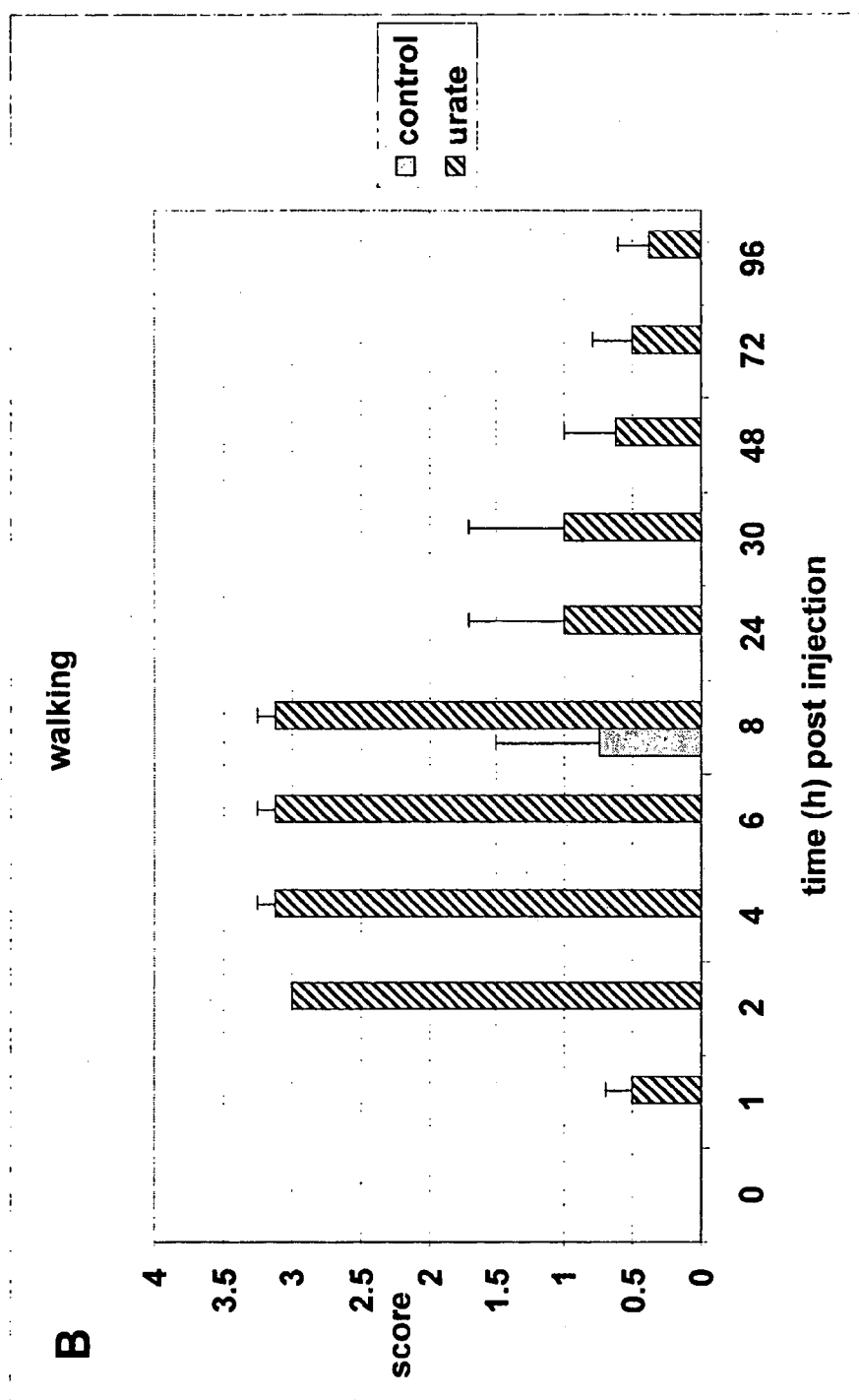


Figure 4 (ctd)

39

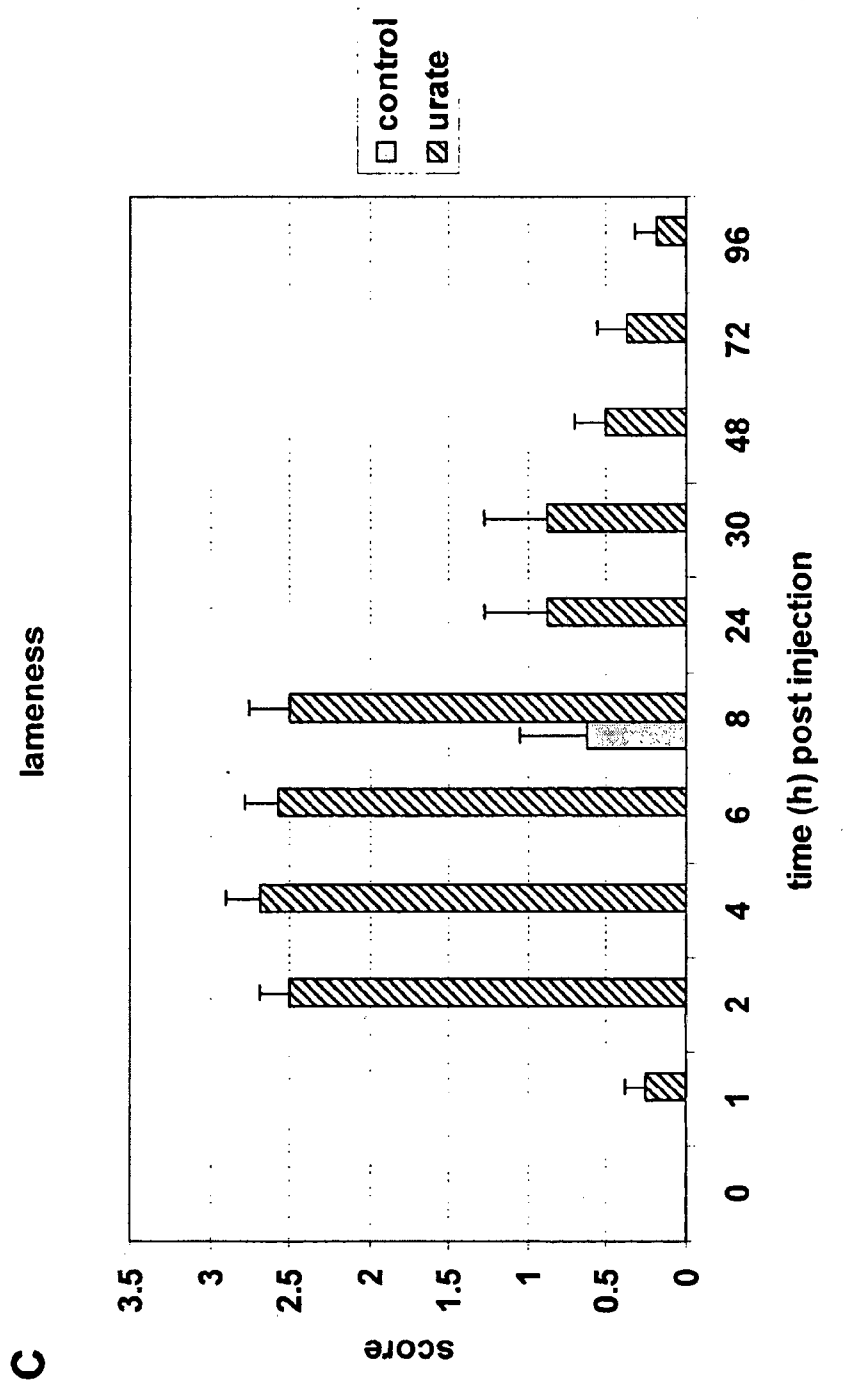


Figure 4 (ctd)

60.

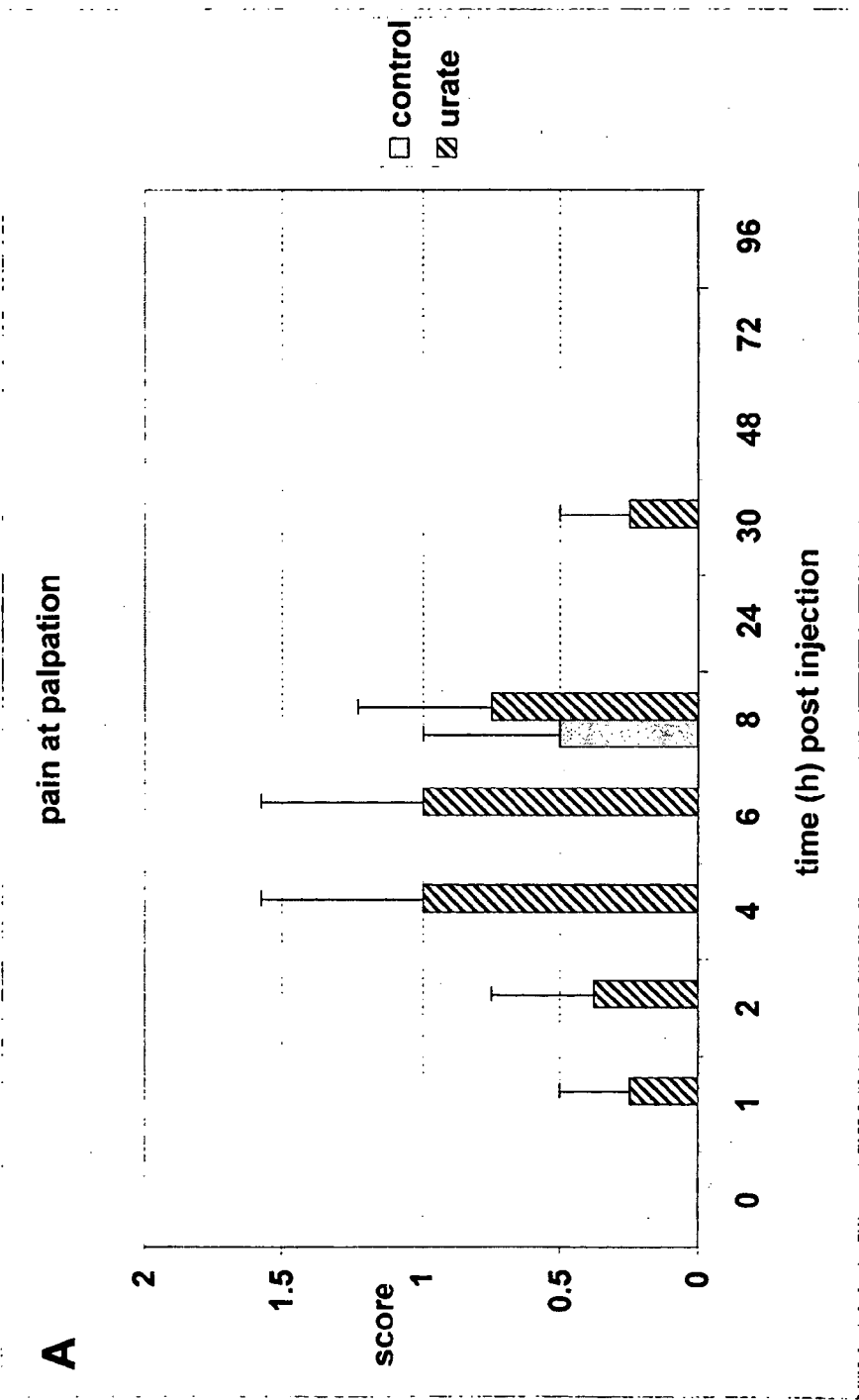


Figure 5

61

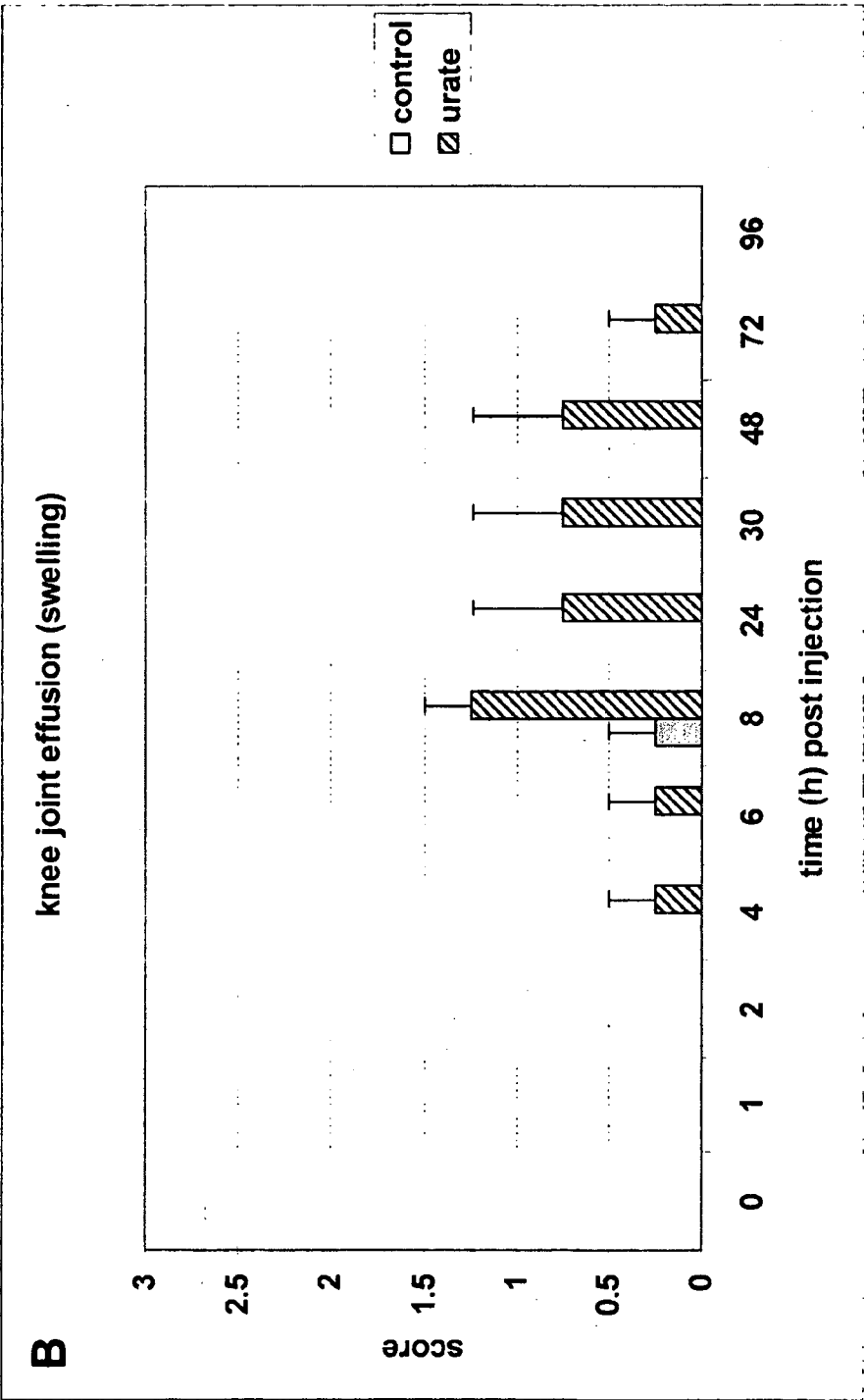


Figure 5 (ctd)

62

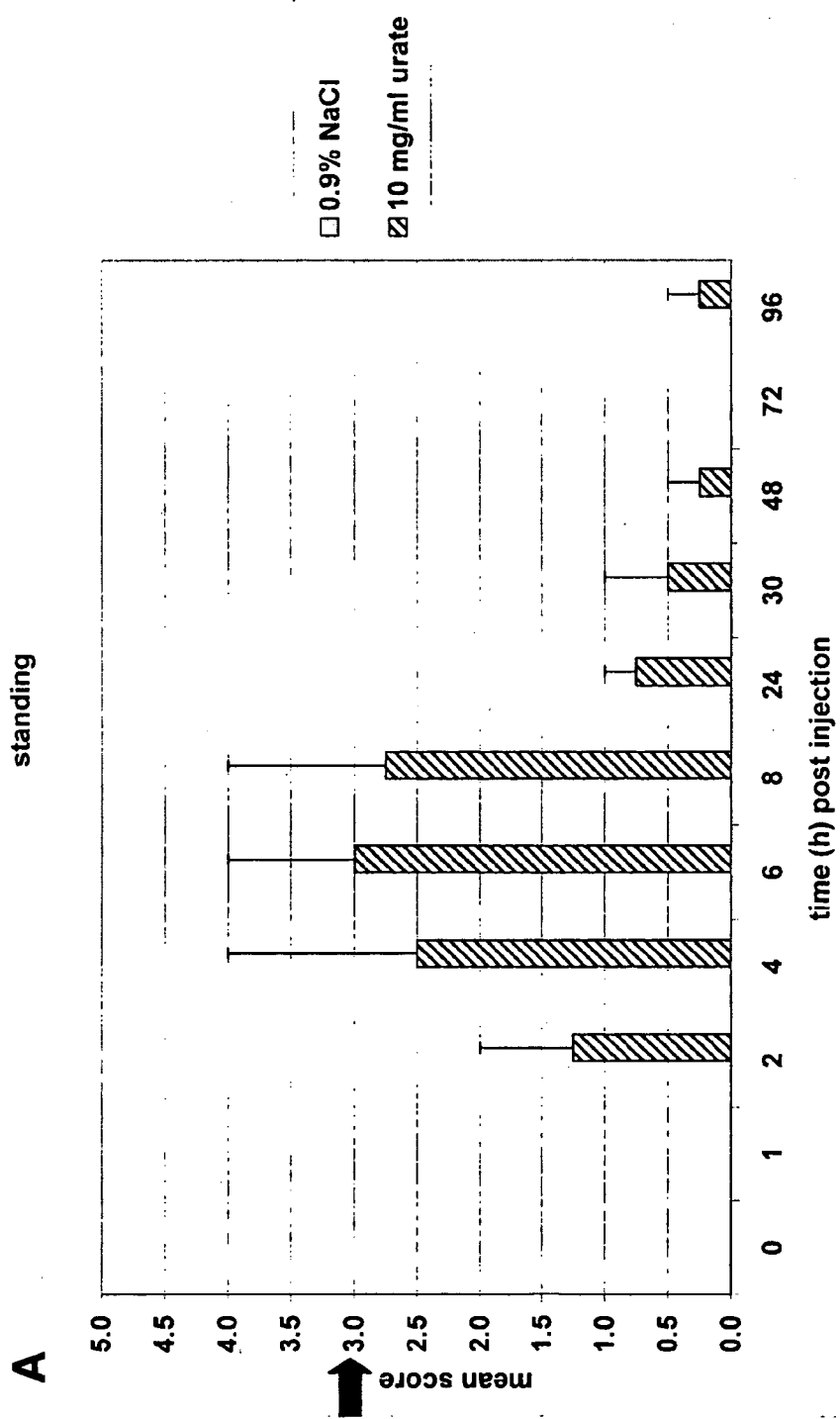


Figure 6

62

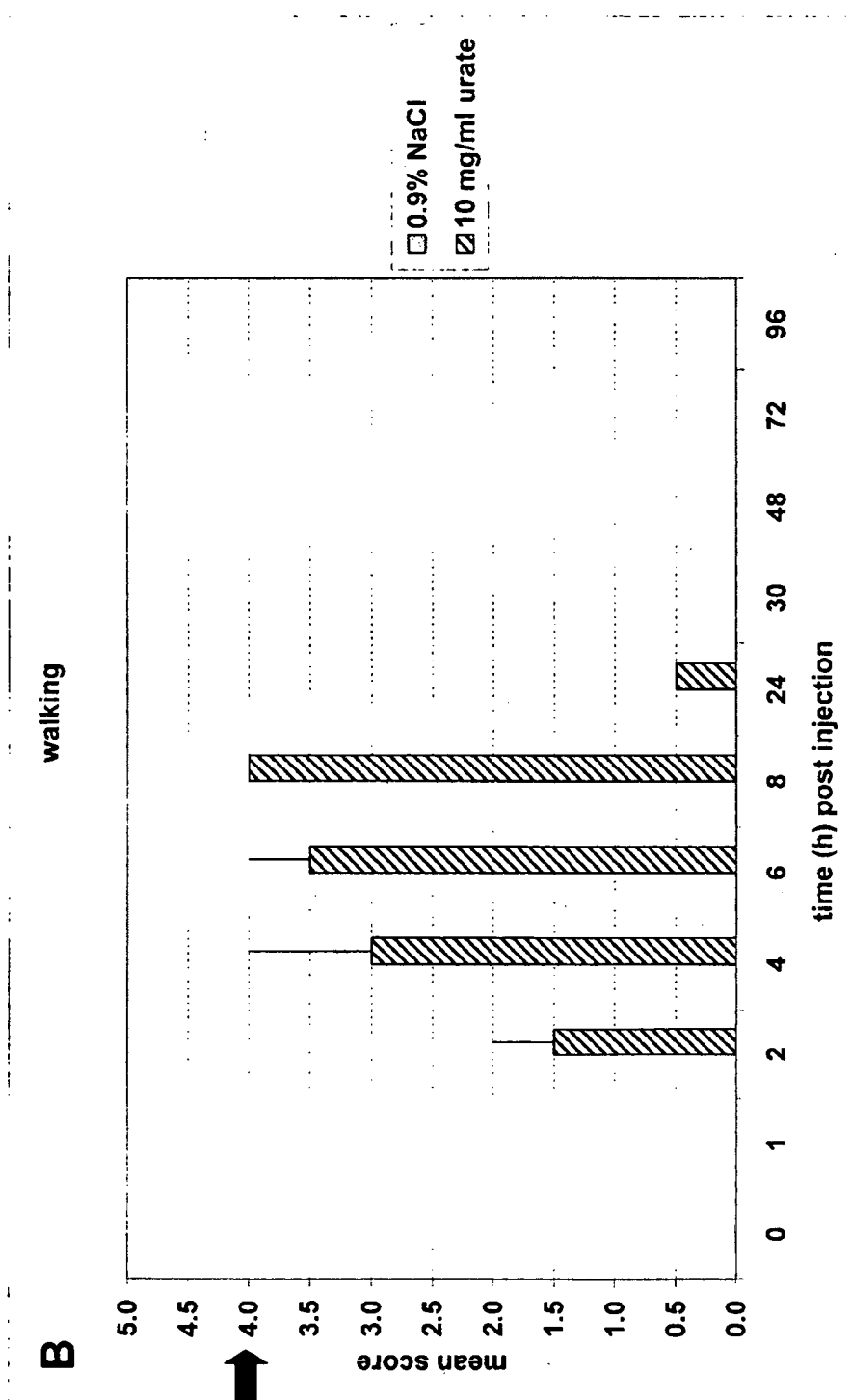


Figure 6 (ctd)

64

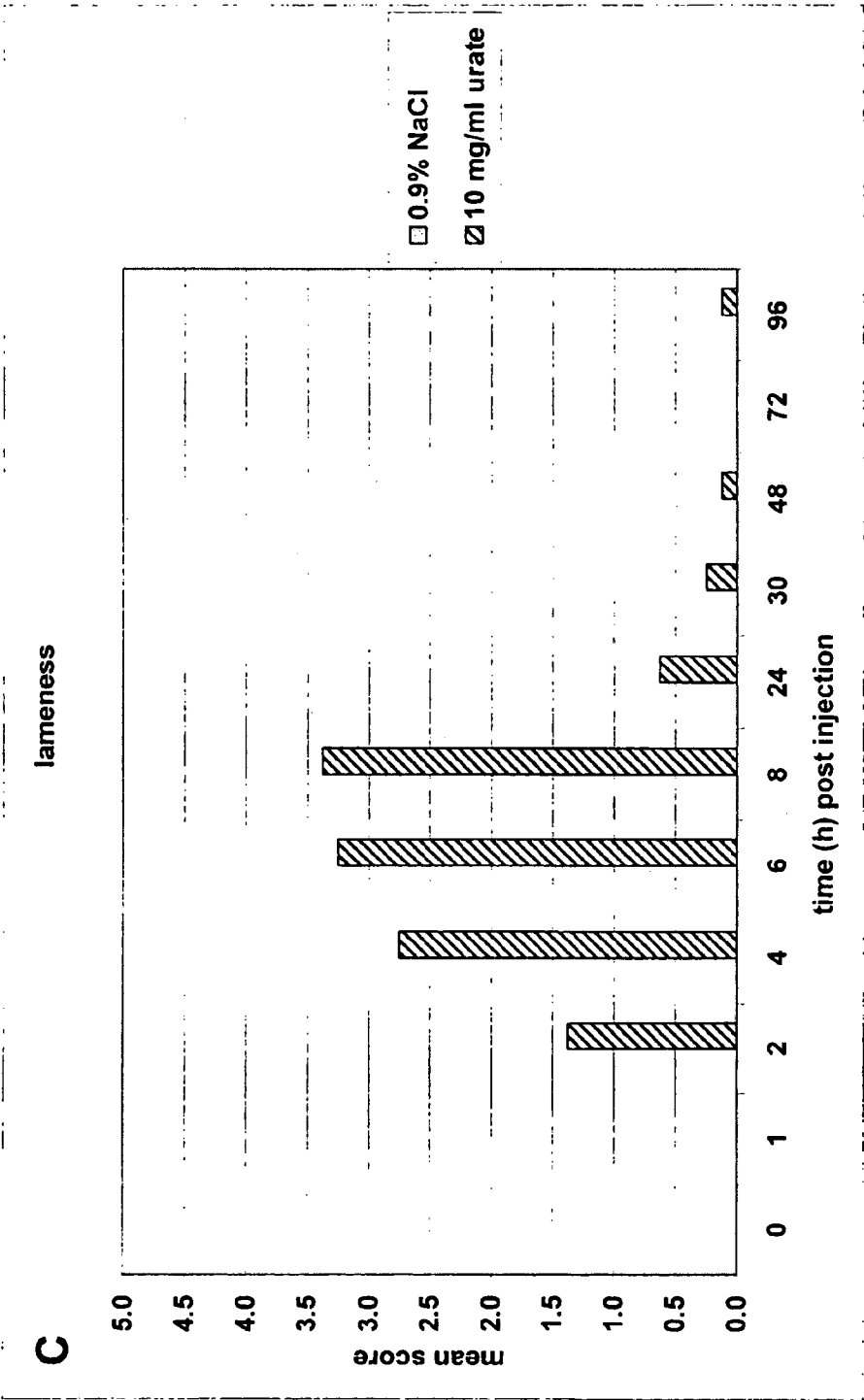


Figure 6 (ctd)

58

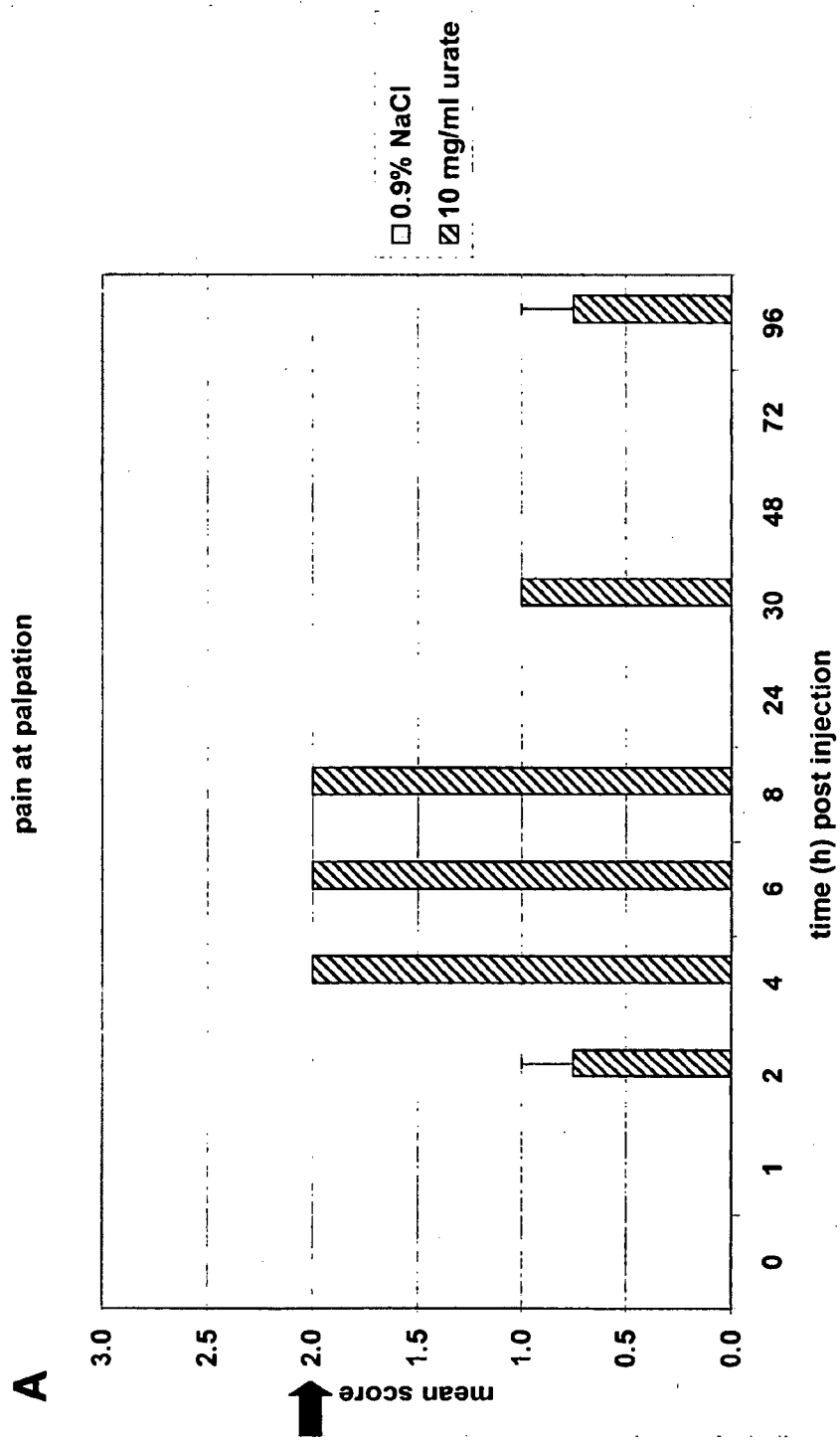


Figure 7

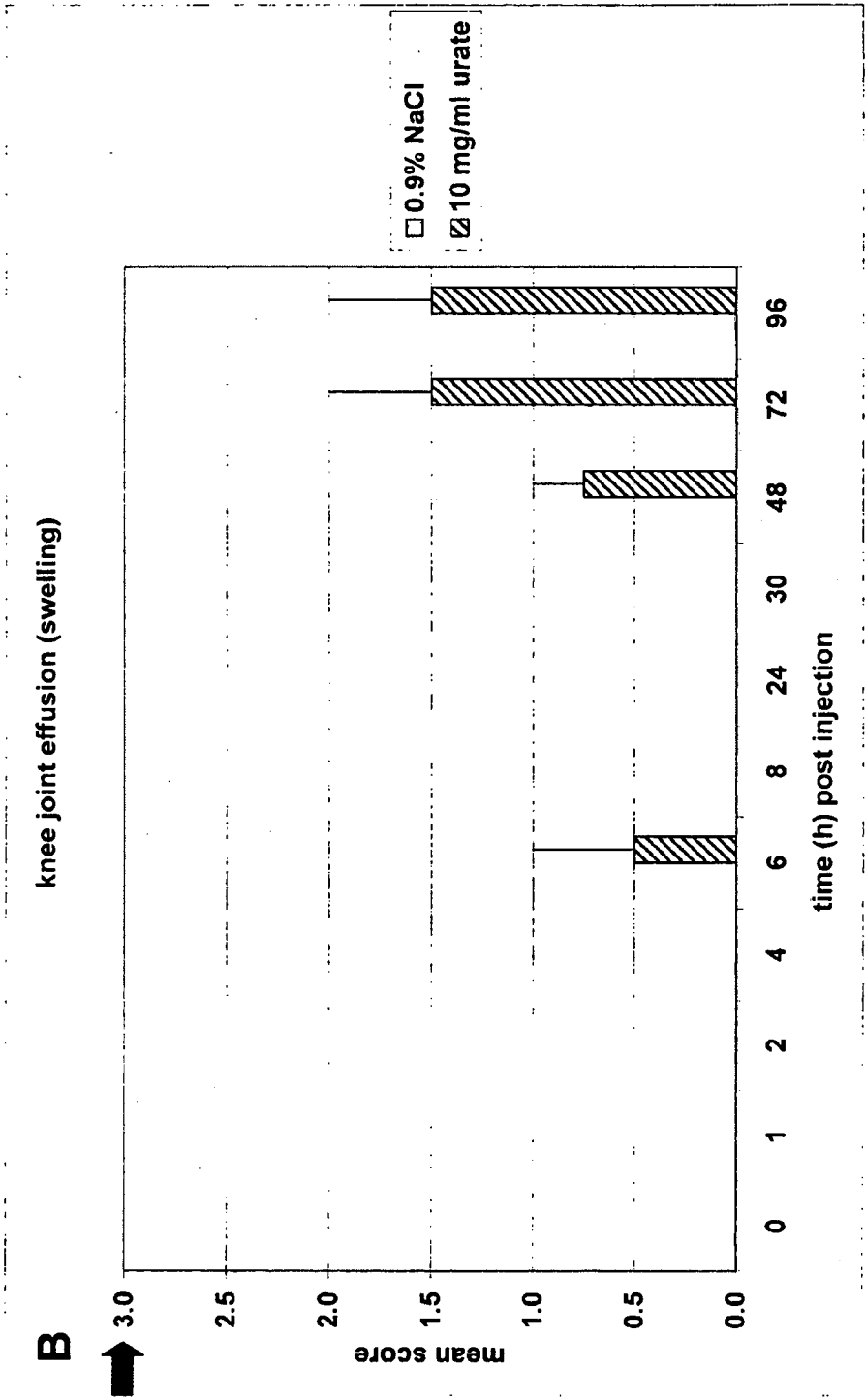


Figure 7 (ctd)

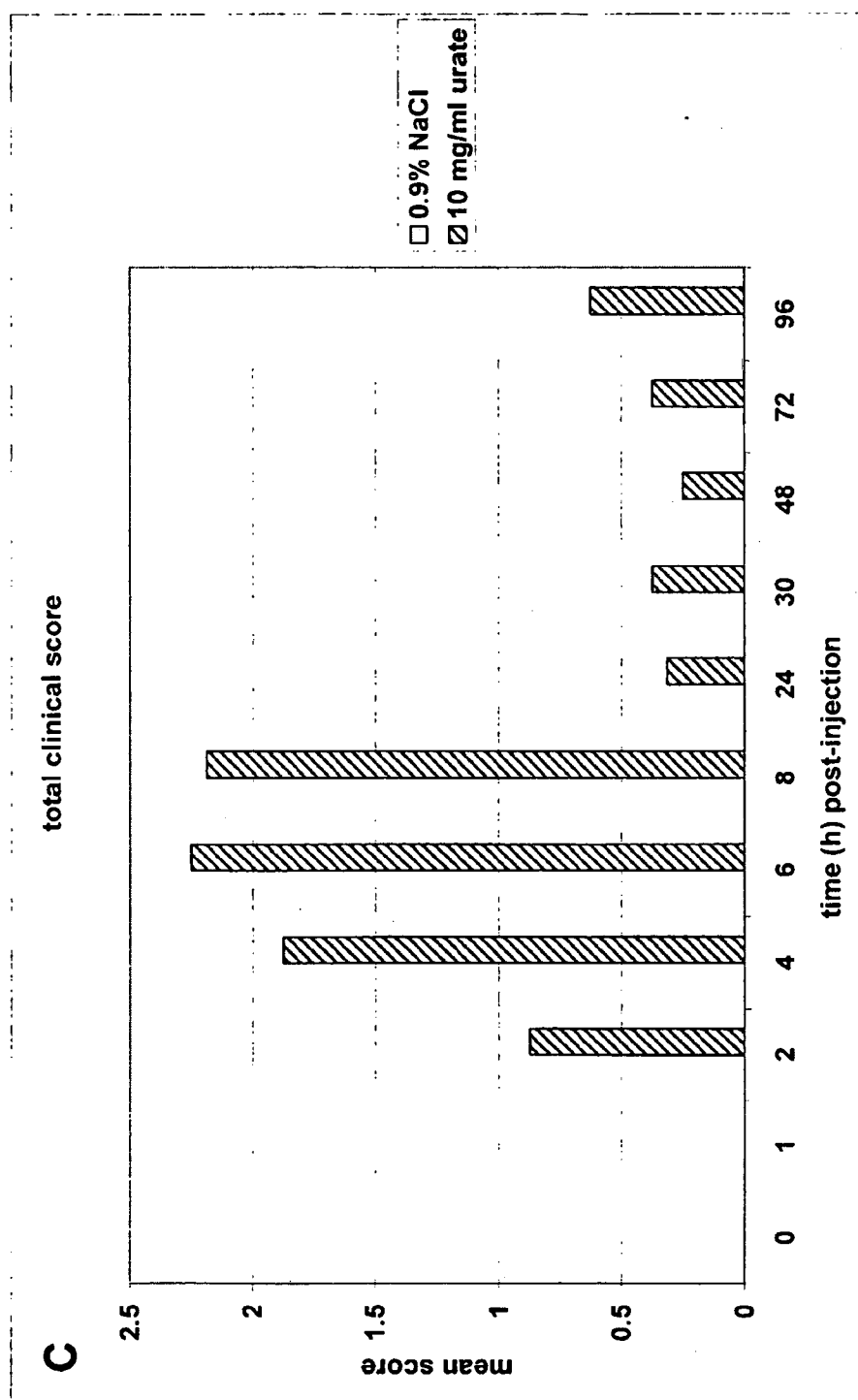


Figure 7 (ctd)

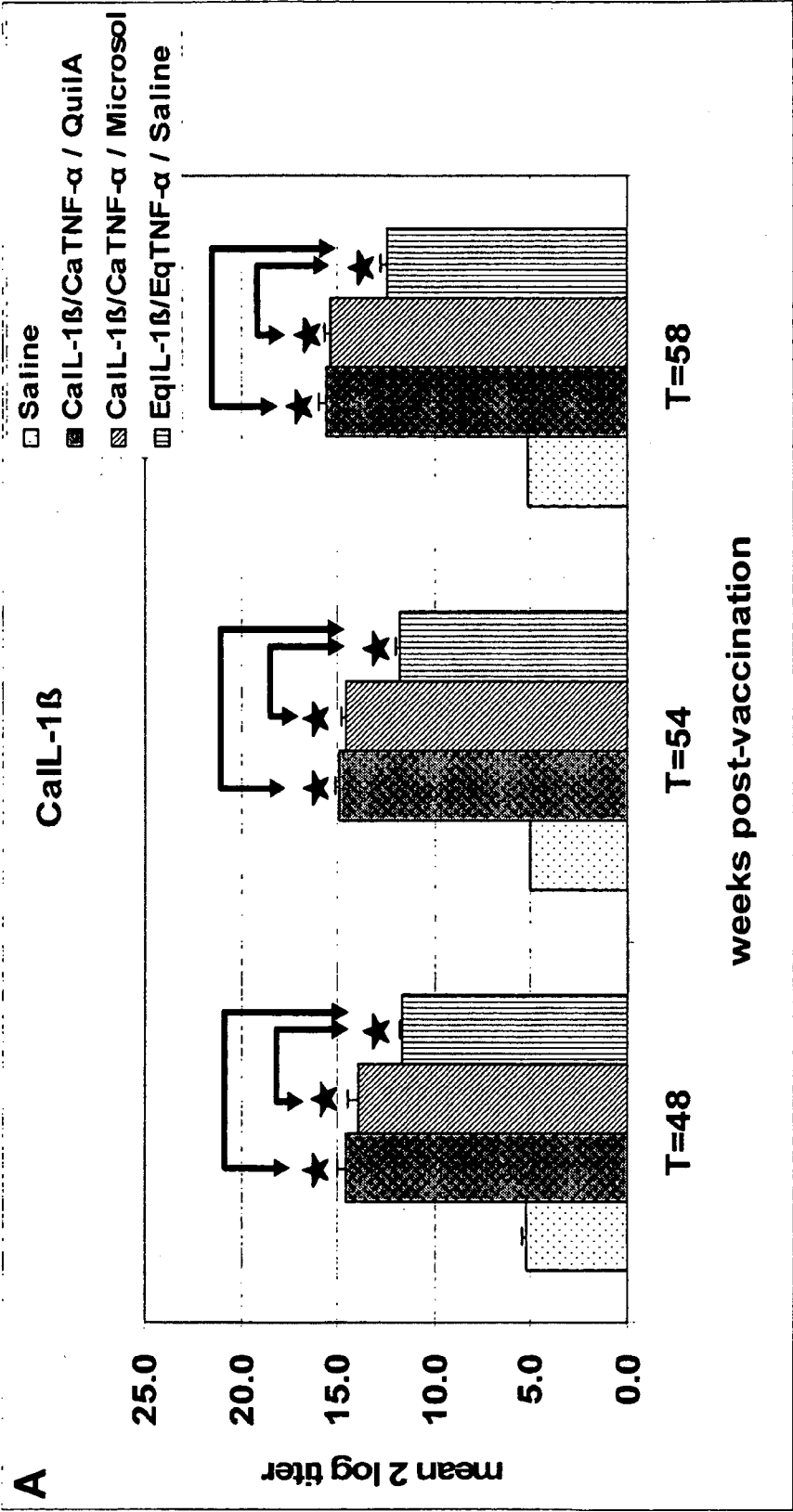


Figure 8

69

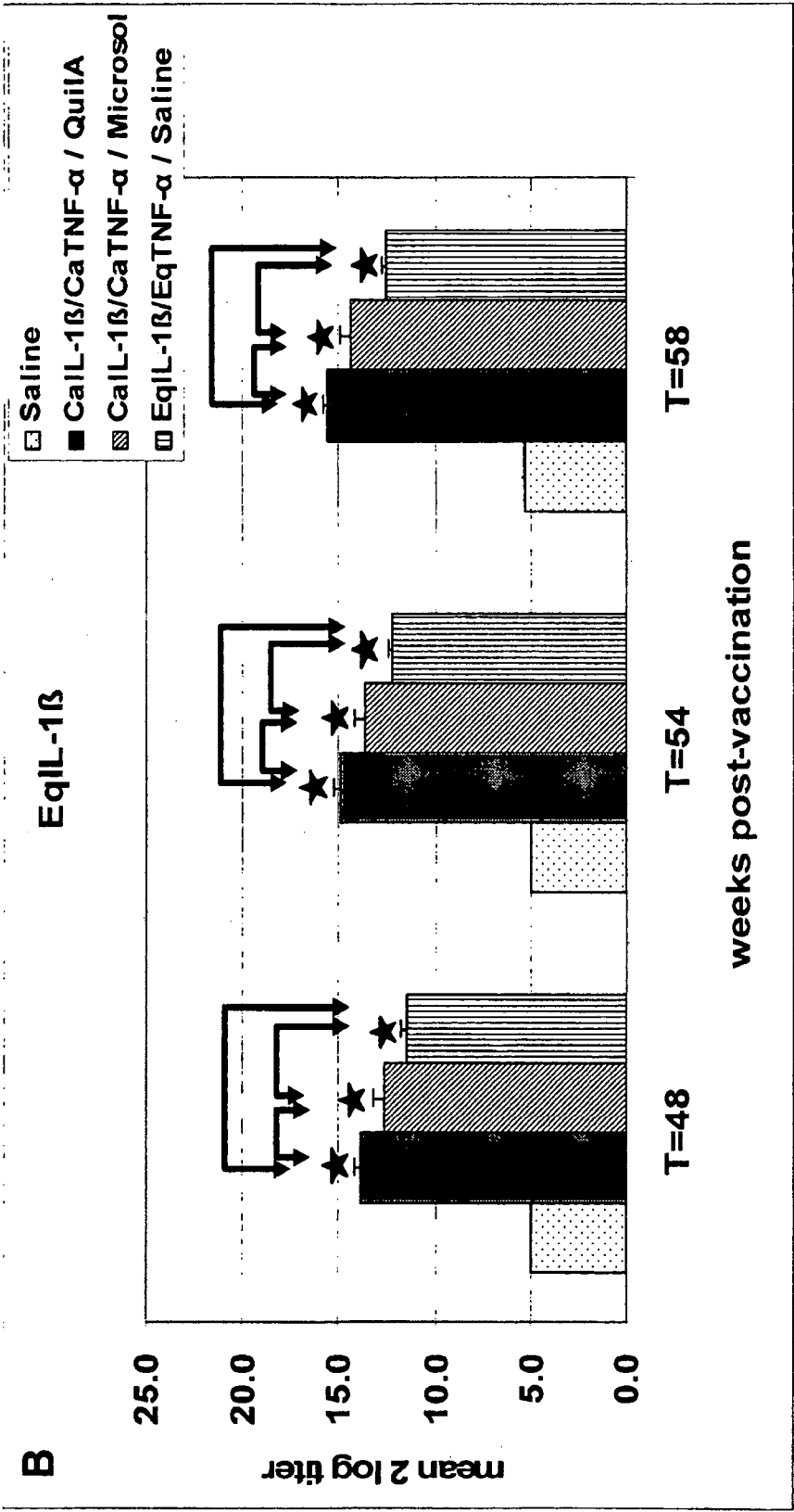


Figure 8 (ctd)

70.

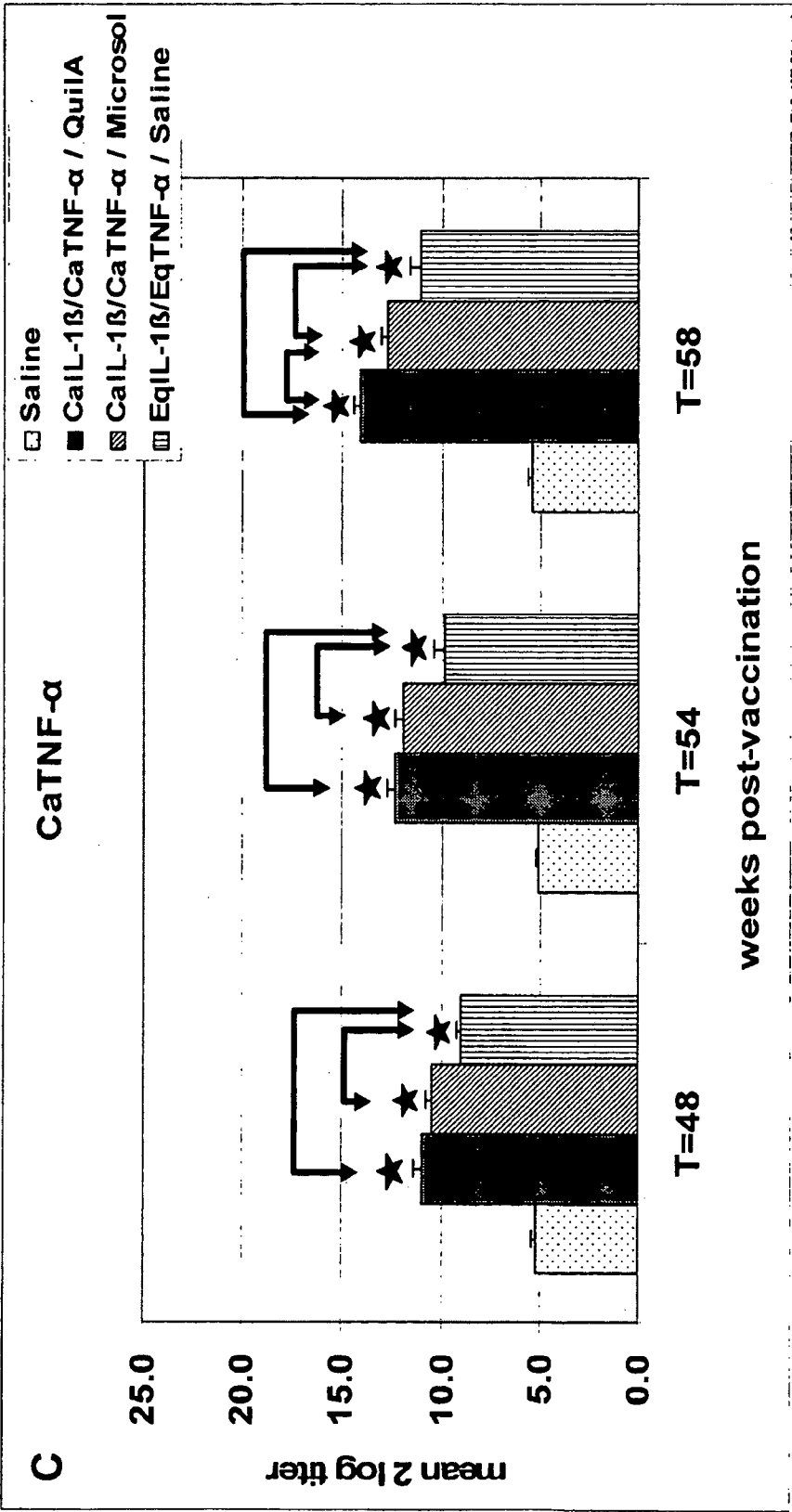


Figure 8 (ctd)

11

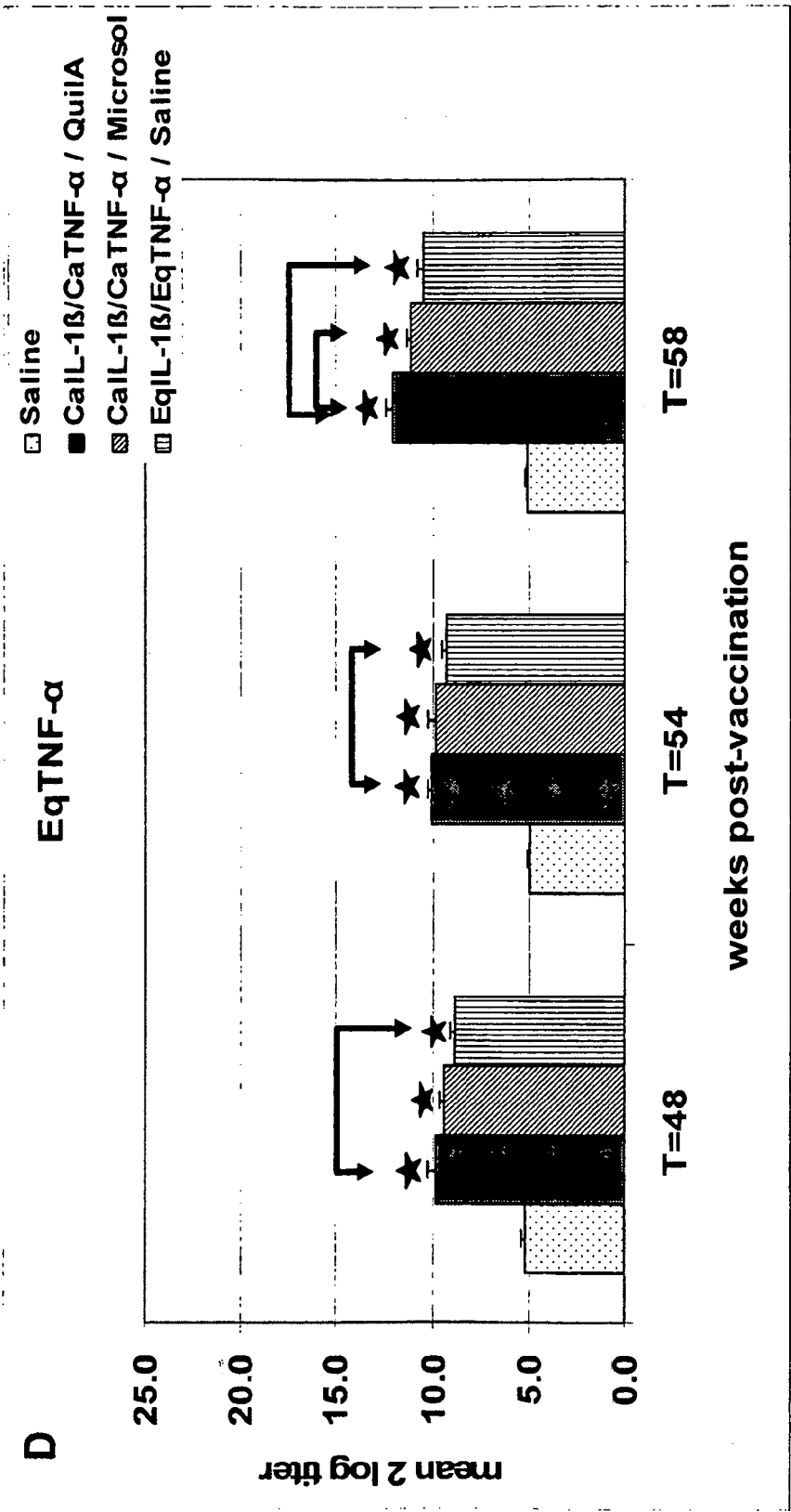


Figure 8 (ctd)

72

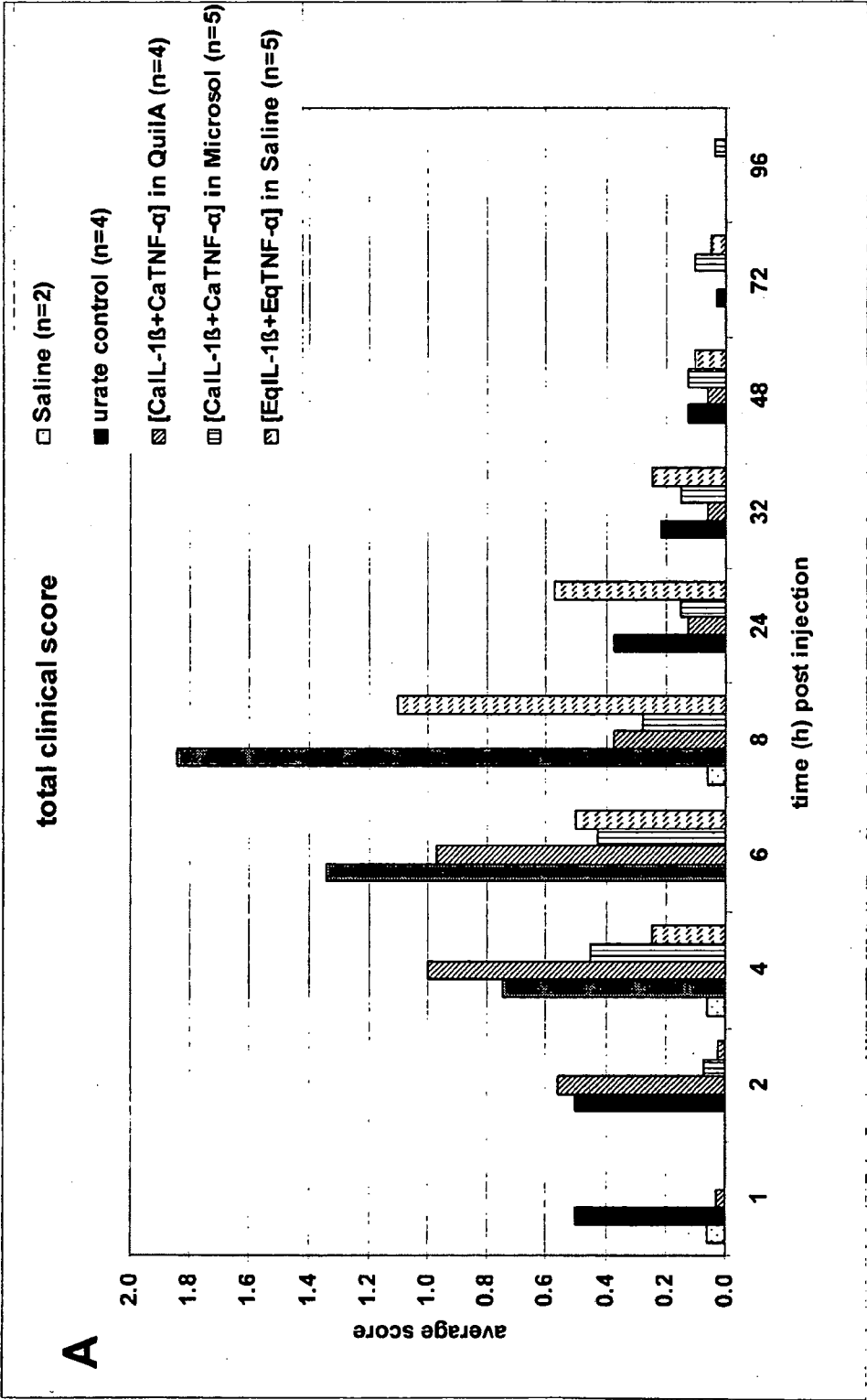


Figure 9

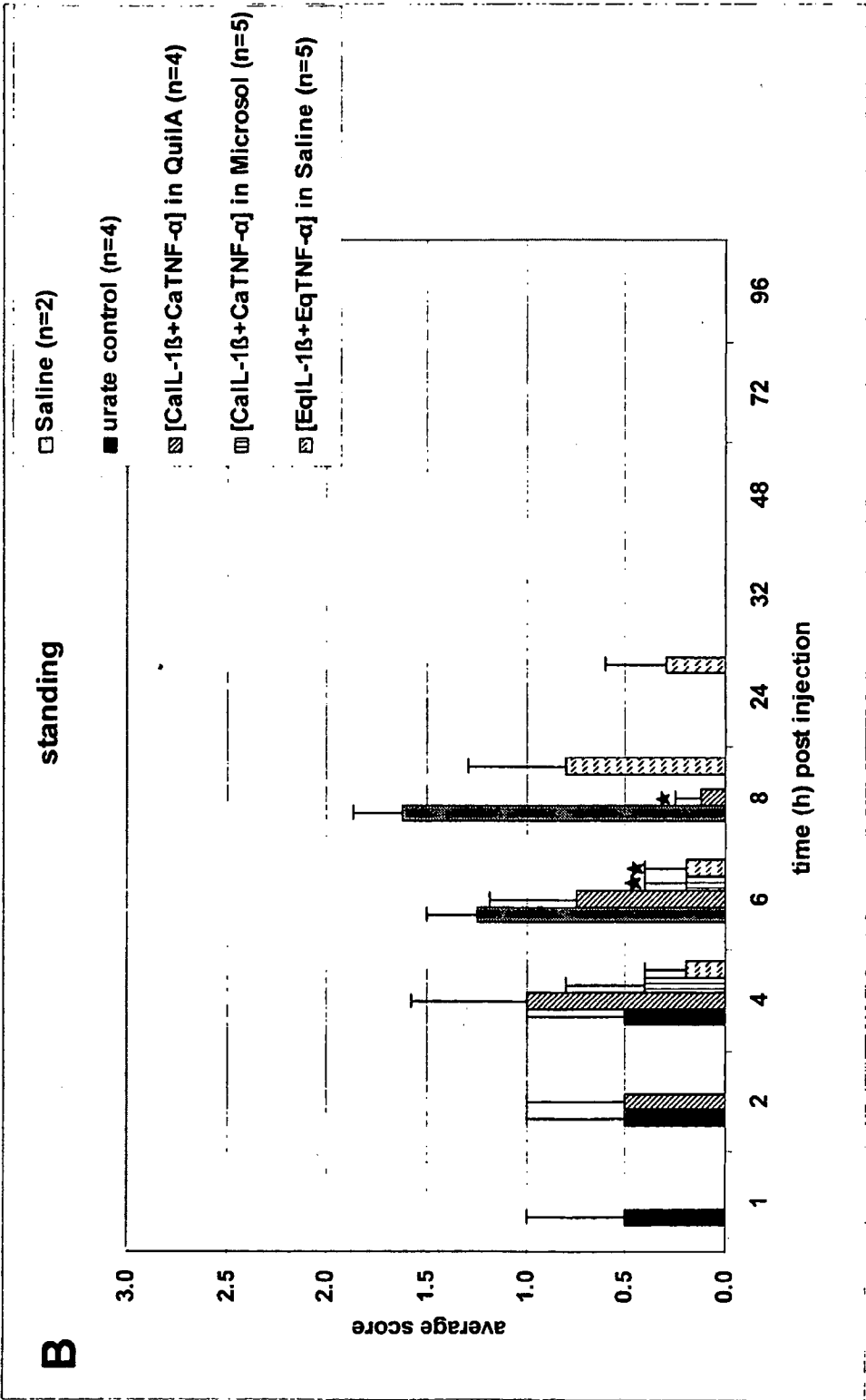


Figure 9 (ctd)

P4

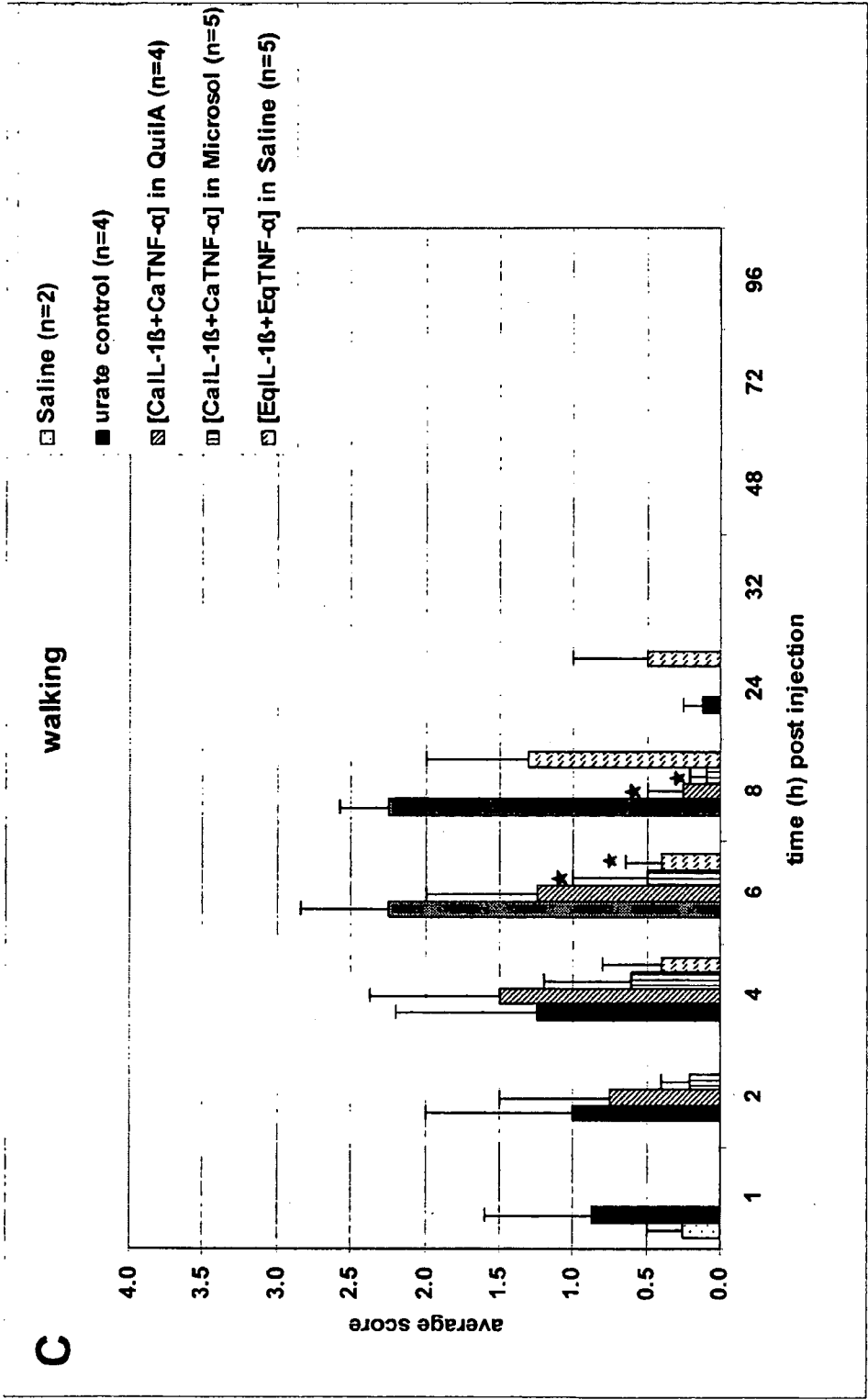


Figure 9 (ctd)

15.

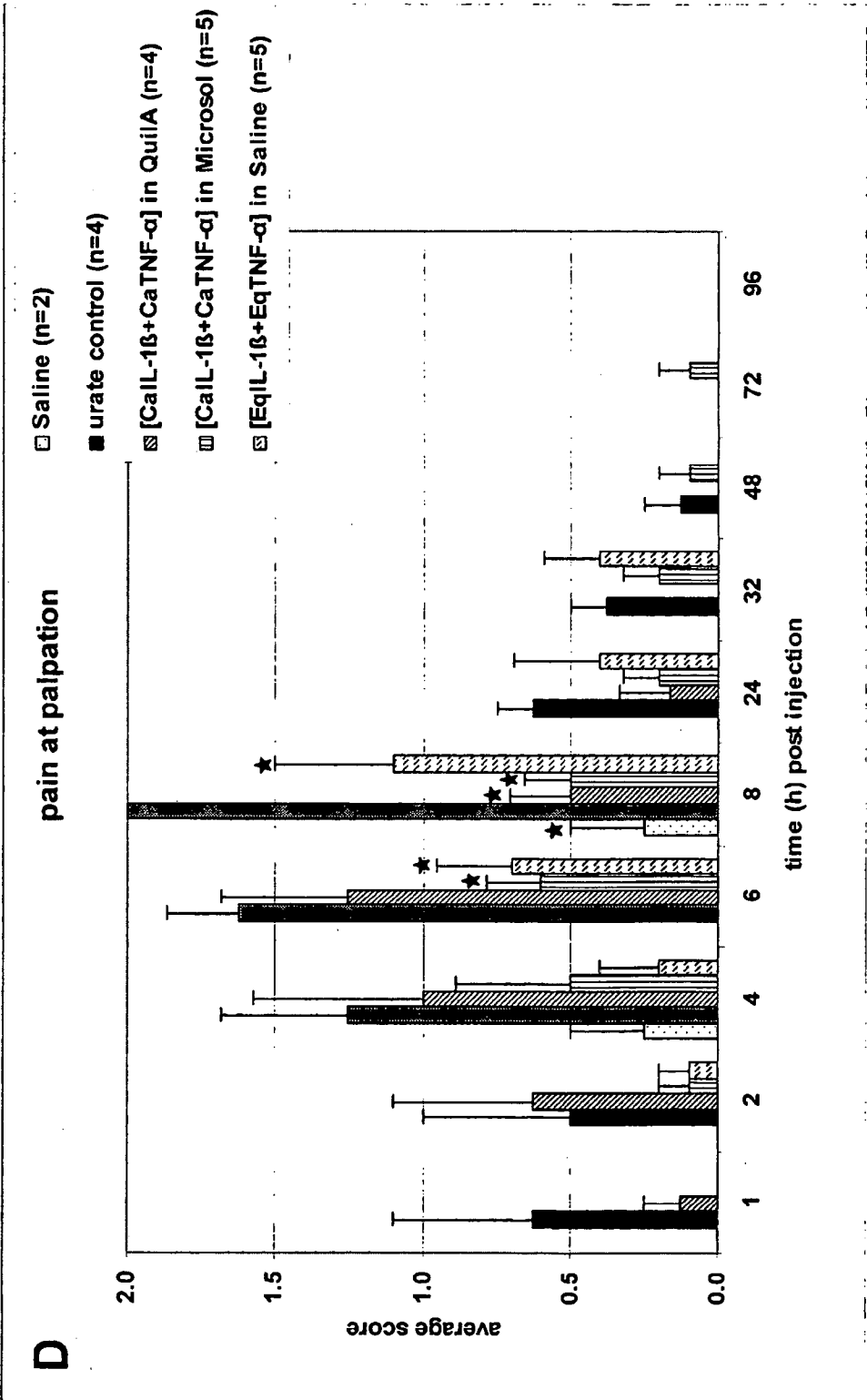


Figure 9 (ctd)

FB.

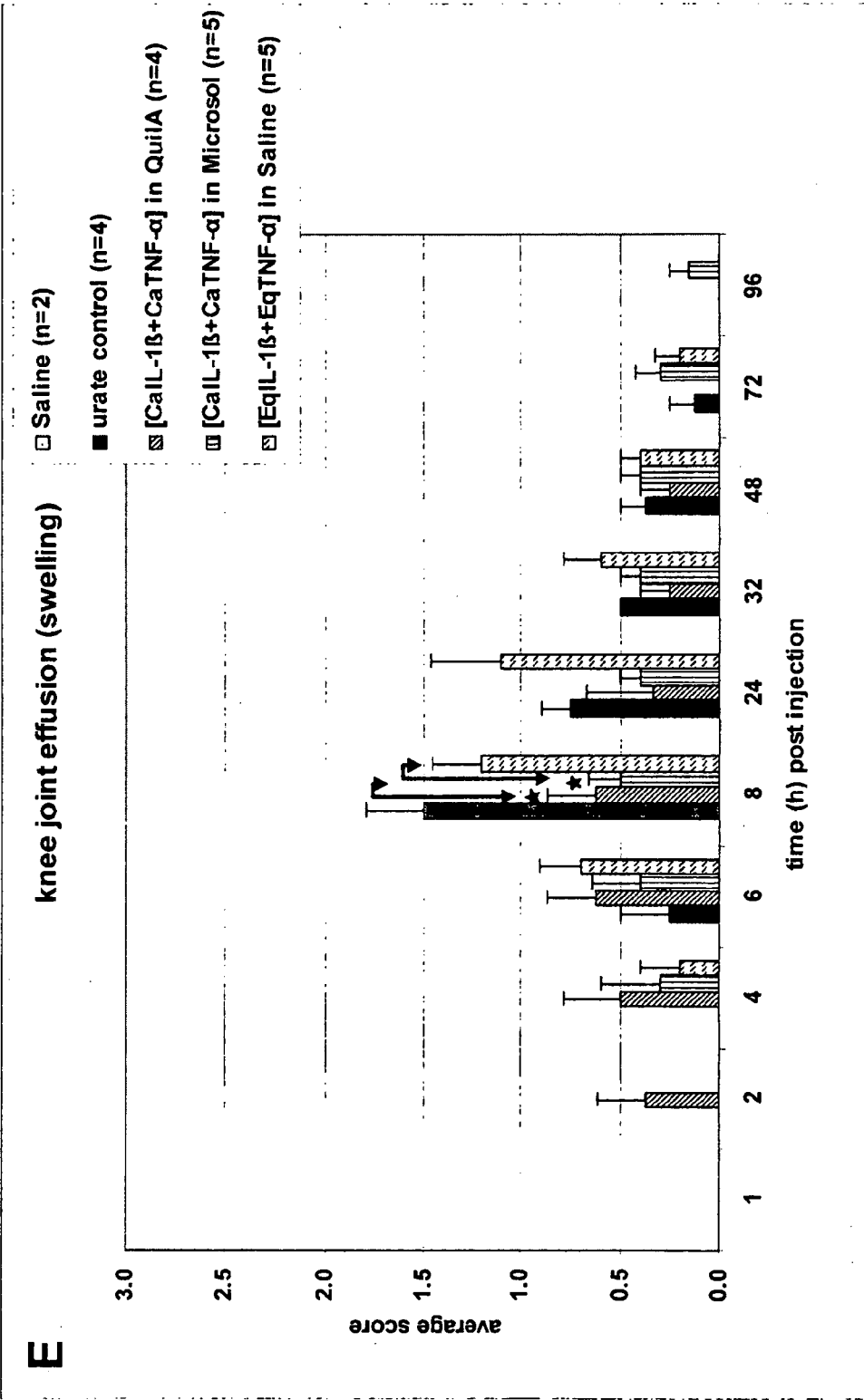


Figure 9 (ctd)

SEQUENCE LISTING

<110> Intervet International BV

<120> Osteo arthritis vaccine

<130> 2007.018

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 585

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> fusion gene

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(582)

<400> 1

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg 48
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

cgc ggc agc cat atg ata tcg aat tca gca gcc atg caa tcg gtg gac 96
Arg Gly Ser His Met Ile Ser Asn Ser Ala Ala Met Gln Ser Val Asp
20 25 30

tgc aag tta cag gac ata agc cac aaa tac ctg gtg ctg tct aac tca 144
Cys Lys Leu Gln Asp Ile Ser His Lys Tyr Leu Val Leu Ser Asn Ser
35 40 45

tat gag ctt cgg gct ctc cac ctc aat ggg gaa aat gtg aac aaa caa 192
Tyr Glu Leu Arg Ala Leu His Leu Asn Gly Glu Asn Val Asn Lys Gln
50 55 60

gtg gtg ttc cac atg agc ttt gtg cac ggg gat gaa agt aat aac aag 240
Val Val Phe His Met Ser Phe Val His Gly Asp Glu Ser Asn Asn Lys
65 70 75 80

ata cct gtg gtc ttg ggc atc aaa caa aag aat ctg tac ctg tcc tgt 288
Ile Pro Val Val Leu Gly Ile Lys Gln Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys
85 90 95

gtg atg aag gat gga aag ccc acc cta cag cta gag aag gta gac ccc 336
Val Met Lys Asp Gly Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Lys Val Asp Pro
100 105 110

aaa gtc tac cca aag agg aag atg gaa aag cga ttt gtc ttc aac aag 384
Lys Val Tyr Pro Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys
115 120 125

ata gaa atc aag aac aca gtg gaa ttt gag tct tct cag tac cct aac 432
Ile Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu Phe Glu Ser Ser Gln Tyr Pro Asn
130 135 140

tgg tac atc agc acc tct caa gtc gaa gga atg cct gtc ttc cta gga 480
Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Val Glu Gly Met Pro Val Phe Leu Gly
145 150 155 160

aat acc aga ggt ggc cag gat ata act gac ttc acc atg gaa ttt tct 528
Asn Thr Arg Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Glu Phe Ser
165 170 175

tcc aca gct gca caa atc act gca gga ata gct tta cat caa tcc aac 576
Ser Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn
180 185 190

ctc aat tag 585
Leu Asn

<210> 2
<211> 194
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ile Ser Asn Ser Ala Ala Met Gln Ser Val Asp
20 25 30

Cys Lys Leu Gln Asp Ile Ser His Lys Tyr Leu Val Leu Ser Asn Ser
35 40 45

Tyr Glu Leu Arg Ala Leu His Leu Asn Gly Glu Asn Val Asn Lys Gln
50 55 60

Val Val Phe His Met Ser Phe Val His Gly Asp Glu Ser Asn Asn Lys
65 70 75 80

Ile Pro Val Val Leu Gly Ile Lys Gln Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys
85 90 95

Val Met Lys Asp Gly Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Lys Val Asp Pro
100 105 110

Lys Val Tyr Pro Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys
115 120 125

Ile Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu Phe Glu Ser Ser Gln Tyr Pro Asn
130 135 140

Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Val Glu Gly Met Pro Val Phe Leu Gly
145 150 155 160

Asn Thr Arg Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Glu Phe Ser
165 170 175

Ser Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn
180 185 190

Leu Asn

<210> 3

<211> 588

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> fusion gene

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(585)

<400> 3

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg 48
Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

cgc ggc agc cat atg gtc aaa tca tct tct cga acc cca agt gac aag 96
Arg Gly Ser His Met Val Lys Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys
20 25 30

cca gta gct cat gtt gta gca aac ccc gaa gct gag ggg cag ctc cag 144
Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Glu Ala Glu Gly Gln Leu Gln
35 40 45

tgg ctg agc cga cgt gcc aat gcc ctc ctg gcc aac ggc gtg gag ctg 192
Trp Leu Ser Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu
50 55 60

aca gac aac cag ctg ata gtg ccg tca gat ggg ttg tac ctc atc tac 240
Thr Asp Asn Gln Leu Ile Val Pro Ser Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr
65 70 75 80

tcc cag gtc ctc ttc aag ggc caa ggg tgc cct tcc acc cat gtg ctc 288
Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
85 90 95

ctc acc cac acc atc agc cgc ttc gcc gtc tcc tac cag aca aag gtc 336
Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Phe Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val
100 105 110

aac cta ctc tct gcc atc aag agc cct tgc caa agg gag acc cca gag 384
Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu
115 120 125

ggg acc gag gcc aag ccc tgg tac gag ccc atc tac ctg gga ggg gtc 432
Gly Thr Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
130 135 140

ttc caa ctg gag aag ggt gat cga ctc agc gct gag atc aat ctg cct 480
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Leu Pro
145 150 155 160

aac tat ctg gac ttt gcc gag tcc ggg cag gtg tac ttt ggg atc att 528
Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile
165 170 175

gcc ctg aca gct gca caa atc act gca gga ata gct tta cat caa tcc 576

Ala Leu Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser
180 185 190

aac ctc aat tag 588
Asn Leu Asn
195

<210> 4
<211> 195
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Val Lys Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys
20 25 30

Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Glu Ala Glu Gly Gln Leu Gln
35 40 45

Trp Leu Ser Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu
50 55 60

Thr Asp Asn Gln Leu Ile Val Pro Ser Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
85 90 95

Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Phe Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val
100 105 110

Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu
115 120 125

82

Gly Thr Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Leu Pro
145 150 155 160

Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile
165 170 175

Ala Leu Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser
180 185 190

Asn Leu Asn
195

<210> 5
<211> 525
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fusion gene

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(522)

<400> 5
atg ggc agc agc cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg 48
Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

cgc ggc agc cat atg gca gct gtg cat tca gtg aac tgc aga ctc cgg 96
Arg Gly Ser His Met Ala Ala Val His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg
20 25 30

gac ata tac cat aaa tcc ctg gtg ctg tcc ggt gca tgt gag ctg cag 144
Asp Ile Tyr His Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln
35 40 45

gct gtc cac ctc aat gga gag aat aca aac caa caa gtg gtg ttc tgc 192
Ala Val His Leu Asn Gly Glu Asn Thr Asn Gln Gln Val Val Phe Cys
50 55 60

atg agc ttt gtg caa gga gaa gaa gag act gac aag ata cct gtg gcc 240
Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr Asp Lys Ile Pro Val Ala
65 70 75 80

tgt ggc ctc aag gga aag aat ctg tac ctg tct tgt ggg acg aaa gat 288
Leu Gly Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Gly Thr Lys Asp
85 90 95

ggg aag ccc atc ctg cag ctg gag aca gta gac ccc aat act tac cca 336
Gly Lys Pro Ile Leu Gln Leu Glu Thr Val Asp Pro Asn Thr Tyr Pro
100 105 110

aag agg aaa atg gaa aag cga ttt gtc ttc aac aag atg gaa atc aag 384
Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met Glu Ile Lys
115 120 125

ggc aac gtg gaa ttt gag tct gca atg tac ccc aac tgg tac atc agc 432
Gly Asn Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser
130 135 140

acc tct caa gca gaa aaa aag cct gtc ttc cta gga aat acc aga ggc 480
Thr Ser Gln Ala Glu Lys Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly
145 150 155 160

ggc cgg gac ata act gac ttc atc atg gaa atc acc tct gcc taa 525
Gly Arg Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala
165 170

<210> 6
<211> 174
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 6

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ala Val His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg
20 25 30

Asp Ile Tyr His Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln
35 40 45

Ala Val His Leu Asn Gly Glu Asn Thr Asn Gln Gln Val Val Phe Cys
50 55 60

Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr Asp Lys Ile Pro Val Ala
65 70 75 80

Leu Gly Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Gly Thr Lys Asp
85 90 95

Gly Lys Pro Ile Leu Gln Leu Glu Thr Val Asp Pro Asn Thr Tyr Pro
100 105 110

Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Asn Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser
130 135 140

Thr Ser Gln Ala Glu Lys Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly
145 150 155 160

Gly Arg Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala
165 170

<210> 7
<211> 537
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> fusion gene

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(534)

<400> 7
atg ggc agc agc cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg 48
Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

85

cgc gcc agc cat atg ctc aga tca tct tct cga acc cca agt gac aag 96
Arg Gly Ser His Met Leu Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys
20 25 30

cct gta gcc cat gtt gta gca aac ccc caa gcc gag ggg cag ctc cag 144
Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln
35 40 45

tgg ctg agt ggg cgt gca aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg aag ctg 192
Trp Leu Ser Gly Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Lys Leu
50 55 60

aca gac aac cag ctg gtg gta cca ttg gat ggg ctg tac ctc atc tac 240
Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Leu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr
65 70 75 80

tcc cag gtc ctc ttc aaa ggc caa ggc tgc cct tcc acc cat gtg ctc 288
Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
85 90 95

ctc acc cac acc atc agc cgc tta gct gtc tcc tac ccg tcc aag gtc 336
Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Leu Ala Val Ser Tyr Pro Ser Lys Val
100 105 110

aac ctc ctc tct gcc atc aag agc cct tgc cac acg gag tcc cca gag 384
Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys His Thr Glu Ser Pro Glu
115 120 125

cag gct gaa gcc aag ccc tgg tat gag ccc atc tac ctg gga gga gtc 432
Gln Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
130 135 140

ttc cag ctg gag aag ggt gat caa ctc agc gct gag atc aat cag ccc 480
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ile Asn Gln Pro
145 150 155 160

aac tat ctc gac ttt gcg gag tcc ggg cag gtc tac ttt ggg atc att 528
Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile
165 170 175

gcc ctg tga 537
Ala Leu

<210> 8
<211> 178
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Leu Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys
20 25 30

Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln
35 40 45

Trp Leu Ser Gly Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Lys Leu
50 55 60

Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Leu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
85 90 95

Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Leu Ala Val Ser Tyr Pro Ser Lys Val
100 105 110

Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys His Thr Glu Ser Pro Glu
115 120 125

Gln Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ile Asn Gln Pro
145 150 155 160

Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile
165 170 175

(54) Título: VACUNA PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una vacuna, para el tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado, que
5 contiene la citoquina IL-1 β y opcionalmente la citoquina TNF- α o derivados de estas y en asociación con las dichas IL-1 β y las opcionales TNF- α o con los derivados de estas una parte no propia con respecto al vertebrado, tal que la vacuna suscite en el vertebrado una respuesta inmune contra las moléculas IL-1 β
10 y TNF- α propias de dicho vertebrado.

Vacuna para el tratamiento de la osteoartritis

La presente invención se refiere a una vacuna para el tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado, el uso de la citoquina IL-1 β y opcionalmente la citoquina TNF- α para
5 producir tal vacuna y el tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado por administración de la vacuna.

La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa, no inflamatoria, de las articulaciones que se presenta principalmente en humanos y en animales mayores, la cual se
10 caracteriza por la degeneración del cartílago articular, la hipertrofia marginal del hueso y cambios en la membrana sinovial. Aunque esta enfermedad puede surgir de múltiples orígenes, generalmente se reconoce que las causas que llevan a su aparición y progreso son fuerzas tanto mecánicas como
15 bioquímicas. La enfermedad está acompañada de dolor y rigidez, en particular después de una actividad prolongada. Es una enfermedad extendida entre humanos y animales, en particular perros y caballos, y como tal es un problema serio de salud tanto humana como animal.

20 Los pacientes con OA benigna pueden tratarse solamente con analgésicos tales como el acetaminofén. Sin embargo, a muchos pacientes se les dan fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAID). Sin embargo, estos NSAID solamente alivian el dolor y tienen efectos colaterales potencialmente peligrosos incluyendo
25 la inducción de úlceras estomacales, sensibilidad a la exposición solar, alteraciones renales, nerviosismo y depresión. Algunos pacientes se tratan con corticoides

inyectados directamente en las articulaciones para retardar el desarrollo de la OA. Sin embargo, esta no es preferencial dados los peligrosos efectos colaterales potenciales. En la literatura también se sugiere tratar la OA por tratamiento in situ, i.e., en la articulación con OA, con antagonistas para las citoquinas las cuales se cree juegan un papel en la mediación de la degradación de la matriz aumentada que caracteriza la lesión del cartílago en la OA. Esto se sabe, por ejemplo, por Pelletier (Arthritis & Rheumatism, Vol. 40, No. 6, June 1997, pp 1012-1019) y Fernandes (Biorheology 39, 2002, 237-246) que describe un tratamiento con terapia genética que se basa en inyecciones intraarticulares del gen (IL-Ra) antagonista del receptor de la interleucina, el cual puede reducir el progreso de lesiones inducidas experimentalmente. Sin embargo, el efecto positivo es muy efímero, y la aplicabilidad como tratamiento tiene todavía que probarse. También, la administración in situ de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una citoquina en sí misma, en particular la interleucina 6, es conocida por la solicitud Europea de patente EP 1 715 891 (Warner-Lambert Company, publicada en 2006). Las desventajas de este tratamiento son las altas dosis requeridas las cuales hacen que el tratamiento sea inherentemente costoso, la administración local (invasiva) y el efecto efímero.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un tratamiento para la osteoartritis que no adolezca, o al menos lo sea en menor extensión, de las desventajas de los tratamientos conocidos para la OA. En este sentido el tratamiento puede: incluir el tratamiento para prevenir la OA,

proporcionar alivio de los signos clínicos, mitigar o curar la enfermedad o suprimir su avance después de que ha comenzado el desarrollo.

Con este fin, se ha desarrollado una vacuna de acuerdo con el
5 preámbulo, que contiene las citoquinas IL-1 β y opcionalmente las citoquinas TNF- α o los derivados de estas, y en asociación con las dichas IL-1 β y TNF- α o los derivados de estas una parte que es no propia con respecto al vertebrado, tal que la vacuna produce una respuesta inmune en el vertebrado contra las
10 moléculas IL-1 β y TNF- α propias. Opcionalmente, la vacuna contiene un medio portador para las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de estas asociado con la parte no propia.

Respecto a esto, una vacuna es de una constitución adecuada para aplicar a un vertebrado, i. e., cualesquier animal vivo
15 que tiene articulaciones, tales como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, incluyendo los humanos (en adelante el término "animal" se usa para denotar cualquier vertebrado). En general una vacuna contiene uno o más antígenos tales como microorganismos atenuados o muertos y subunidades de los
20 mismos, o cualquier otra sustancia tal como un metabolito de un organismo. Al administrar la vacuna a un animal, se produce una respuesta inmune contra los antígenos, respuesta que ayudará a evitar, aliviar o tratar una enfermedad o trastorno. Característicamente el antígeno(s) se combina(n) con un medio
25 portador para antígenos, al que frecuentemente se hace referencia como "portador farmacéuticamente aceptable". Tal portador puede ser cualquier solvente, medio de dispersión,

recubrimiento, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y retardante de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles con el vertebrado. Algunos ejemplos de tales medios portadores son agua, solución salina, solución salina con búfer de fosfato, fluido de cultivo bacteriano, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de estos. Estos pueden proporcionarse para una forma de dosificación líquida, semisólida y sólida, dependiendo del modo de administración propuesto. Como es de conocimiento común, la presencia del medio portador no es esencial para la eficacia de una vacuna, pero puede simplificar de manera significativa la dosificación y la administración del antígeno.

Una vacuna puede contener adicionalmente agentes inmunoestimulantes no específicos a los que frecuentemente se hace referencia como adyuvantes. En principio, puede definirse como adyuvante toda sustancia que tiene la habilidad de favorecer o amplificar un proceso particular en la cascada de eventos inmunológicos, conduciendo finalmente a una mejor respuesta inmunológica (i. e., la respuesta corporal integrada a un antígeno, en particular la mediada por linfocitos y que característicamente involucra el reconocimiento de antígenos por anticuerpos específicos o por linfocitos sensibilizados previamente). Nótese que el adyuvante generalmente no se requiere para que dicho proceso particular se lleve a cabo, pero favorece o amplifica dicho proceso.

La vacuna de la presente invención se basa en el uso de las citoquinas IL-1 β (interleucina 1 β) y TNF- α (Factor α de Necrosis Tumoral). En general las citoquinas son proteínas no-

anticuerpos liberadas por colonias de células en contacto con antígenos, las cuales actúan como mediadores intracelulares en la generación de una respuesta inmune. La interleucina 1 β es un subgrupo de la clase de las interleucinas, una clase de proteínas que son secretadas mayormente por los macrófagos y los linfocitos T e inducen crecimiento y diferenciación de linfocitos y células hematopoyéticas de tallo. Es un inmunomodulador potente que media en un amplio rango de respuestas inmunes e inflamatorias incluyendo la activación de las células B y T. El TNF- α es el miembro mejor conocido de la familia del "Factor de Necrosis Tumoral", una familia que representa proteínas producidas i.e., por macrófagos en presencia de una endotoxina y que experimentalmente han mostrado ser i.a., capaces de atacar y destruir tumores cancerosos. En el caso presente, la vacuna contiene IL-1 β y TNF- α o derivados de estos y asociada con ellos una parte no propia con respecto al vertebrado. No propia, en este sentido, significa que es inmunogénica en el animal tratado, i.a., es capaz de producir una respuesta inmune. Como es de conocimiento común, usando una parte no propia asociada con otra molécula, se puede proporcionar una respuesta inmune contra esta otra molécula, aún si esta otra molécula es propia con respecto al animal. Una parte no propia (o múltiples partes) asociada con la citoquinas podría suministrarse simplemente por elección de una IL-1 β y una TNF- α que sea heteróloga para el animal. Heterólogo, con respecto a esto, significa que no se deriva de la misma especie (al contrario de homólogo). En este caso, las citoquinas contienen inherentemente en su estructura molecular

partes que son no propias con respecto al animal tratado. Otra posibilidad podría ser por ejemplo escoger una citoquina que sea homóloga al animal tratado, pero sea un mutante, o se la suministra con una parte proteica foránea por técnicas recombinantes. Otras maneras de proporcionar una parte no propia asociada con las citoquinas o sus derivados son, por ejemplo, acoplar física o químicamente una o más moléculas no propias, una estructura no propia, o compuesto, o sólo cualquier constitución no propia de las citoquinas. En cualquier evento, se proporciona un constructor inmunogénico en donde existe una conexión operativa entre la citoquina o sus derivados y la parte no propia, de manera que el constructor es capaz de suscitar una respuesta inmune contra las citoquinas propias (i.e., IL-1 β y TNF- α). Como aquí se indicó anteriormente, la técnica para desarrollar vacunas contra proteínas propias (conocidas también como proteínas autólogas) es de conocimiento común desde la mitad de los años ochenta del siglo 20, e.g., por acoplamiento químico de la proteína propia a una proteína portadora inmunogénica, foránea y grande (US 4.161.519), o por preparación de constructores de fusión entre la proteína propia y la proteína portadora foránea (WO 86/07383), o por sustitución de tan poco como un solo epítipo auxiliar T foráneo en la proteína propia (WO 95/05849). En estos casos la parte no propia de los constructores inmunogénicos es responsable de la provisión de epítopos de los linfocitos T-auxiliares que proporcionan el rompimiento de la posible autotolerancia. Es de notar que un derivado de IL-1 β y/o de TNF- α con respecto a la presente invención significa una

molécula que es más pequeña o más grande que la citoquina inicial, pero aún contiene una o más partes que son homólogas con esta citoquina inicial, cuya parte o partes constituyen un determinante antigénico de estas citoquinas. Tal parte puede

5 ser tan pequeña como un solo epítipo. El empleo de tan poco como un solo epítipo tiene la ventaja de que pueden producirse anticuerpos muy específicos, de hecho anticuerpos monoclonales, contra los propios IL-1 β y TNF- α . Esto reduce o aún impide totalmente el riesgo de reacción cruzada con otras citoquinas.

10 Este principio como tal es de conocimiento común y, por ejemplo, se ha descrito en WO 2005/084198, WO 03/084979 y EP 218521, los cuales divulgan explícitamente péptidos inmunogénicos (i.e., péptidos capaces de inducir una respuesta inmune) de las citoquinas. Es de notar que en las vacunas se

15 pueden usar derivados para ambas citoquinas al mismo tiempo, pero también, que una de las citoquinas se usa en su forma natural, y la otra es un derivado de su forma natural.

El solicitante encontró, sorprendentemente, que la osteoartritis puede tratarse exitosamente administrando una

20 vacuna de acuerdo con la presente invención. En particular, se ha encontrado que cuando los animales se vacunan antes de desarrollar OA, aparecen menos signos clínicos cuando el animal desarrolla efectivamente OA. Los signos clínicos de la enfermedad se suprimen sin ningún efecto colateral severo

25 crónico. Dados estos resultados positivos, no queda duda de que, contrario a lo que podría esperarse, cantidades adecuadas del anticuerpo producido IL-1 β y, cuando es aplicable, del TNF- α alcanzan la articulación con OA. Sabiendo que cuando los

antagonistas de la citoquina están presentes en una articulación con OA se contiene el avance de la OA (ver Pelletier, Fernandes y Warner-Lambert Company como se mencionó anteriormente), los animales tratados con una vacuna de acuerdo con la invención son menos susceptibles al avance de la OA. Puesto que la OA es una enfermedad degenerativa progresiva, se entiende que los resultados correspondientes se obtienen cuando se tratan animales con la vacuna de acuerdo con la invención después de que han comenzado a desarrollar OA. Sin estar apegados a la teoría, la inesperada ausencia de efectos colaterales crónicos podrá explicarse asumiendo que la vacunación con la vacuna de acuerdo con la invención no conduce a un bloqueo funcional completo de las citoquinas propias IL-1 β y TNF- α en el animal, pero sí a la reducción de la concentración de estas citoquinas en la articulación, i.e., a un nivel normal.

Es de notar que Goldring (Clinical Orthopaedics and related research, No 427S, pp S27-S36) menciona que se ha sugerido que las citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 y TNF- α contribuyen a alterar la función del condrito lo cual conduce a la degradación progresiva de la matriz del cartílago y la pérdida de la función de la articulación. Sin embargo, él manifiesta también que un estudio reciente por Clemens (Arthritis & Rheumatism, Vol. 48, No. 12, pp 3452-3463, 2003) mostró que la supresión con genes de la IL-1 β o de la enzima convertidora a IL-1 β incluso acelera el desarrollo de la osteoartritis de rodilla. Así, la técnica precedente es ambigua acerca del papel de estas citoquinas en la OA. Aún no se sabe

sin ambigüedad cuándo estimulan o suprimen la OA. Esto es aceptado en un artículo reciente que describe un programa de investigación para evaluar el papel de las citoquinas en el desarrollo de la OA (Baggio, Veterinary Immunology and Immunopathology 107 (2005) 27-39). Este artículo menciona explícitamente que se ha informado que tanto la IL-1 como la TNF promueven la OA pero que todavía hay apertura acerca de cuándo sea apropiada la abolición de estas citoquinas para tratar la OA. Wildbaum (Immunity, Vol. 19, 679-688, November, 2003) incluso informa que la neutralización de TNF- α suprime la enfermedad inflamatoria artritis reumatoide pero no la osteoartritis. Así, el médico experimentado no llegará sin ambigüedad a una supresión de IL-1 β y opcionalmente TNF- α cuando busque un tratamiento para la OA. Además, se sabe explícitamente desde la técnica precedente que cuando un tratamiento in situ con un antagonista de citoquina puede ayudar contra la OA, una opción sistémica no funciona (ver EP 1 715 891; ejemplo 3). Esto está en línea con la comprensión general de que las articulaciones son definitivamente difíciles de alcanzar a causa de la barrera para la sangre en la articulación (Bas et al., British Journal de Rheumatology, 1996; 35(6): 548-552 and Kushner et al., Arthritis Rheum, 1971; 14(5): 560-570).

También es notorio que se conocen muchas referencias relacionadas con el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas, en donde se ha mostrado que las enfermedades pueden tratarse empleando una vacuna que contiene IL-1 y TNF- α para producir una respuesta inmune contra IL-1 y/o TNF- α propias.

Un ejemplo típico de tal referencia es WO 2007/039552, asignada a Cytos Biothecnology AG, Switzerland. En la inflamación, como opuesta a una enfermedad tal como la OA, el papel de las citoquinas es muy claro: baja regulación proporciona alivio y así, esto es efectivo para el tratamiento. En las referencias mencionadas a menudo se sugiere y aún se determina, sin divulgar pruebas en forma de ejemplos, que el mismo tratamiento sería efectivo también en la osteoartritis porque se sabe que IL-1 β y TNF- α pueden jugar un papel en esta enfermedad. Sin embargo, como se explicó anteriormente en esta, la OA es una enfermedad no inflamatoria y por lo tanto completamente diferente de las enfermedades inflamatorias. El papel de las citoquinas tales como IL-1 β y/o TNF- α no es claro todavía e incluso parece ser ambiguo.

Por lo tanto, para los médicos con experiencia en el campo de la Osteoartritis, tales referencias no proporcionan una base justificada aún para la expectativa de una oportunidad razonable de éxito al tratar la OA empleando IL-1 β y/o TNF- α inmunogénicas, permitiendo solamente esperar que una IL-1 β inmunogénica y una TNF- α opcionalmente inmunogénica, dadas sistemáticamente, proporcionen un tratamiento adecuado para la OA.

Brevemente, hay dos razones importantes por las que el hombre experimentado, basado en el conocimiento disponible acerca de la osteoartritis, se abstendría de desarrollar una vacuna contra la IL-1 β y opcionalmente contra la TNF- α para tratar la OA: Primero, la técnica precedente no enseña sin ambigüedad el

papel de las citoquinas, en particular IL-1 β y TNF- α , en la OA y segundo, un planteamiento sistémico empleando un antagonista de citoquina para regular el papel de las citoquinas en la articulación misma ha demostrado no ser exitoso, aún cuando el tratamiento in situ basado en el mismo antagonista ha probado ser exitoso. Por lo tanto la persona con experiencia, basada en el conocimiento tal como está disponible actualmente, se abstendría de desarrollar una vacuna contra las citoquinas IL-1 β y/o TNF- α propias para tratar la OA, aún más desde que esto significa que habrá un ataque sistémico contra esas citoquinas que podría ser altamente desventajoso. Por ejemplo, se sabe que la interleucina-1 está involucrada en la respuesta inmune contra la infección microbiana, para aumentar el número de células de la médula ósea, para jugar un papel crítico en la sanación de las heridas orales, para tener efectos antidiabéticos y hasta para modular eventos celulares durante las últimas etapas de la gestación. Por lo tanto el bloqueo de esta citoquina es visto generalmente como indeseable.

En una modalidad, las citoquinas IL-1 β y TNF- α o las derivadas de estas son homólogas con respecto al vertebrado que se trata. Homólogo, en éste sentido, significa derivado de la misma especie, en oposición a heterólogo según se definió en esta anteriormente.

Contrariamente a lo que podría esperarse, se ha encontrado que las citoquinas antígenas derivadas de la misma especie inducen títulos más altos de anticuerpos en el vertebrado en tratamiento.

En otra modalidad, la parte no propia con respecto al vertebrado contiene un determinante antigénico derivado de un microorganismo. Un microorganismo en este sentido significa un organismo de tamaño microscópico o submicroscópico, en particular perteneciente a bacterias, levaduras, mohos, protozoos, algas, rickettsia, microbios o virus. Parece que al incluir tal determinante antigénico, i.e., un epítipo que proporciona una región inmunológicamente activa que se une a los receptores de membrana específicos del antígeno sobre los linfocitos a los anticuerpos secretados, se pueden proporcionar títulos altos de anticuerpos contra las citoquinas propias del vertebrado.

En otra modalidad más, la parte que es no propia con respecto al vertebrado contiene un adyuvante. Como se estableció previamente en este documento, un adyuvante puede ser en principio cualquier agente inmunoestimulante no específico. La parte adyuvante puede estar asociada con las citoquinas IL-1 β y TNF- α o sus derivados por cualquier enlace físico o químico, o de cualquier otra manera en tanto que el adyuvante esté en conexión operativa con las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de estas, i.e., en tanto que la parte adyuvante sea apta para estimular una respuesta inmune contra estas citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de estas, y por lo tanto también contra los correspondientes determinantes antigénicos de las IL-1 β y TNF- α propias del vertebrado. Los adyuvantes pueden clasificarse en general de acuerdo con los eventos inmunológicos que inducen. La primera clase, que

comprende i.e., los ISCOM (complejos inmunoestimulantes), saponinas (o fracciones y derivados de estas tales como QuilA), hidróxido de aluminio, co-quelatos, ácido poliláctico/glicólico, facilita la toma del antígeno, el

5 transporte y la presentación por las APC (células que presentan el antígeno). La segunda clase que comprende i.a., emulsiones de aceite, geles, microesferas de polímero, copolímeros de bloque no iónicos y muy probablemente también hidróxido de aluminio, proporciona un efecto de depósito. La tercera clase,

10 que comprende i.a., motivos (motifs) ricos en CpG, lípido A de monofosforilo, micobacterias (dipéptido de muramilo), extractos de levadura, toxina del cólera, se basa en el reconocimiento de estructuras microbianas conservadas, denominadas estructuras microbianas asociadas a patógeno (PAMP), definidas como señal

15 0. La cuarta clase, que comprende i.a., agentes tensoactivos en emulsión de aceite, hidróxido de aluminio, hipoxia, se basa en la estimulación de la capacidad del sistema inmune para distinguir entre peligroso e inocuo (los cuales no necesariamente son lo mismo que propio y no propio). La quinta

20 clase, que comprende i.a., citoquinas, se basa en la regulación al interior de moléculas co-estimulantes, señal 2, sobre las APC. Un adyuvante ayuda a proporcionar una respuesta inmune adecuada. Por esto, es menos crucial que la parte no propia de las citoquinas o los derivados de estas sea apta ya para romper

25 la autotolerancia. Por consiguiente un adyuvante proporciona más libertad para la elección de los antígenos. En particular con los adyuvantes de clase 1, se han obtenido buenos resultados al incorporarlos por ejemplo con saponinas,

fracciones de estas y emulsiones de aceite en agua (e.g., liposomas).

En todavía otra modalidad, las citoquinas IL-1 β y TNF- α o sus derivados tienen una bioactividad que es reducida cuando se la
5 compara con la s citoquinas IL-1 β y TNF- α del vertebrado. Una bioactividad reducida, i.e., un efecto reducido del agente sobre el animal vivo o sobre su tejido, reduce el riesgo de efectos colaterales agudos por administración de la vacuna. Cuando no se reduce la actividad de las citoquinas, pueden
10 presentarse efectos colaterales agudos tales como vómitos, shock, cólicos, etc. La reducción de la bioactividad puede obtenerse por varios procedimientos de inactivación de las citoquinas tales como el tratamiento químico con formaldehído similar al empleado para convertir las toxinas bacterianas en
15 toxoides. Tales métodos son del conocimiento común en la técnica de la tecnología de las vacunas. En un paso alternativo, pueden producirse citoquinas mutantes con bioactividad reducida. Esto también es de conocimiento común en la técnica. Es de notar que también se hace referencia a las
20 citoquinas con bioactividad reducida como bioinactivas (aunque sustancialmente conservan bioactividad).

La invención se refiere también al uso de las citoquinas IL-1 β y TNF- α para producir una vacuna para el tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado y al tratamiento en sí mismo. La
25 vacuna puede administrarse por cualquier vía convencional empleada en la técnica de la tecnología de vacunas. En particular por vía intramuscular, vía subcutánea, intradérmica

o de submucosa o por vía intravenosa, por ejemplo en forma de una suspensión inyectable. La administración puede efectuarse como dosis única o como dosis repetida una o más veces después de cierto intervalo. La dosis apropiada puede variar *inter alia* en función del peso del individuo tratado.

La invención se explicará más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Inducción de anticuerpos contra las IL-1 β y TNF- α propias en perros.

Proteínas recombinantes caninas (Ca) y equinas (Eq). Se clonaron CaIL-1 β , CaTNF- α , EqIL-1 β y EqTNF- α empleando técnicas estándar de Biología Molecular que usan ARN aislado de linfocitos de sangre periférica (PBL) extraídos respectivamente de sangre de perro o de caballo. El terminal 3' de las moléculas Ca se fusionó genéticamente con el epítipo de células T (17 aa) mínimo de la proteína de fusión del Virus Canine Distemper (CDV-F) (Ghosh et al. (2001) Immunology **104** pp 58-66). Los fragmentos de cADN que codifican IL-1 β y TNF- α se ligaron finalmente a un vector pET de tal manera que el extremo 5' estaba en encuadre con un marcador His (para propósitos de purificación). Las IL-1 β y TNF- α de equino no se marcaron con CDV. Todas las proteínas fueron expresadas por *E. coli*, se purificaron con marcador His y se verificó su contenido de LPS. Todas las proteínas que se usaron como antígenos tenían un contenido de LPS < 20 U/ml. La SEQ ID 1 representa el ADN para

la Ca IL-1 β mínima marcada con CDV-F. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo CDV-F (17 aminoácidos + codón sin sentido). La SEQ ID 2 representa la mínima proteína propia Ca IL-1 β marcada con CDV-F. La SEQ ID 3 representa el ADN para el Ca TNF α mínimo marcado con CDV-F. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 535-588 representan el epítipo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido). La SEQ ID 4 representa la mínima proteína propia Ca TNF α marcada con CDV-F. La SEQ ID 5 representa el ADN PARA EL IL-1 β Equino. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His. La SEQ ID 6 representa la proteína propia del IL-1 β Equino. La SEQ ID 7 representa el ADN para el TNF α Equino. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His. La SEQ ID 8 representa la proteína propia del TNF α Equino.

Después de estas moléculas silvestres según se indicó en el párrafo anterior, y para evitar posibles reacciones sistémicas adversas, se generó una serie de moléculas mutantes (mt) bio-inactivas, empleando mutagénesis dirigida al sitio (nota: en esta especificación se hace referencia a, o indicación de, las moléculas silvestres bioactivas como "wt"; se hace referencia a, o indicación de, las moléculas silvestres mutantes bio-inactivas o "menos" bio-activas como "mt"; cuando no hay referencia o indicación, se entiende la forma silvestre). Estos mutantes se fusionaron genéticamente, por el extremo 3', al epítipo mínimo de la célula T (17 aa) o al epítipo máximo (32 aa) de la proteína de fusión del Virus

Canine Distemper (CDV-F) (Ghosh et al. (2001) *Immunology* **104** pp. 58-66), y por el extremo 5' (después de la marcación con His) al epítipo máximo de la célula T (35 aa) del Virus Canine Parvo (CPV) (Rimmelzwaan et al. (1990) *J. Gen. Virology* **71** pp. 2321-2329). Los sitios de mutación se escogieron con base en la literatura científica disponible acerca de las IL-1 β y TNF- α humanas: Simon et al. (1993) *J. Biol. Chem.* **268** pp.9771-9779 and Evans et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270** pp. 11477-11483 para mutaciones de punto en IL-1 β , y Zhang et al. (1992) *J. Biol. Chem.* **267** pp. 24069-24075 para mutaciones de punto en TNF- α . Un mutante TNF- α (mutante No 12, ver adelante) es un derivado de mutaciones de punto específico combinadas con mutaciones espontáneas. Todas las proteínas fueron expresadas por *E. coli*, purificadas por marcación con His y se verificó el contenido de LPS. Todas las proteínas analizadas empleadas como antígenos tuvieron un contenido de LPS < 20 U/ml. Se hicieron dieciocho mutantes bio-inactivos. El ADN que codifica estos mutantes se registra a continuación.

El mutante No 1 es codificado por el ADN del mutante H30G CaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-75 de este ADN representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), los nucleótidos 163C>G y 164A>G representan la mutación H30G.

El mutante No 2 es codificado por el ADN del mutante K92G CaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-72 representan el marcador His, los nucleótidos 529-582 representan el epítipo

mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), los nucleótidos 346A>G y 347A>G representan la mutación K92G.

El mutante No 3 es codificado por el ADN del mutante doble H30G CaIL-1 β más K92G CaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los
5 nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), los nucleótidos 163C>G y 164A>G representan la mutación H30G, los nucleótidos 349A>G y 350A>G representan la mutación K92G.

10 El mutante No 4 es codificado por el ADN del mutante C7S CaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 98G>C representa la mutación C7S.

15 El mutante No 5 es codificado por el ADN del mutante K8E CaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), los nucleótidos 100A>G y 102G>A representan la mutación K8E.

20 El mutante No 6 es codificado por el ADN del mutante L9S CaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 104T>C representa la mutación L9S.

25 El mutante No 7 es codificado por el ADN del mutante triple C7S más K8E, más L9SCaIL-1 β con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos

1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 532-585 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 98G>C representa la mutación C7S, los nucleótidos 100A>G y 102G>A representan la mutación K8E, el
5 nucleótido 104T>C representa la mutación L9S.

El mutante No 8 es codificado por el ADN del mutante C7S CaIL-1 β con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 76-171 representan el epítipo máximo CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 628-726
10 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 194G>C representa la mutación C7S.

El mutante No 9 es codificado por el ADN del mutante K8E CaIL-1 β con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 76-171 representan el epítipo máximo CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 628-726
15 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), los nucleótidos 196A>G y 198G>A representan la mutación K8E.

El mutante No 10 es codificado por el ADN del mutante L9S CaIL-1 β con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-75 representan el marcador His, los nucleótidos 76-171 representan el epítipo máximo CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 628-726
20 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 200T>C representa la mutación L9S.

25 El mutante No 11 es codificado por el ADN del mutante triple C7S más K8E más L9SCaIL-1 β con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-76 representan el marcador His, los nucleótidos

76-171 representan el epítipo máximo CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 628-726 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 194G>C representa la mutación C7S, los nucleótidos 196A>G y 198G>A
5 representan la mutación K8E, el nucleótido 200T>C representa la mutación L9S.

El mutante No 12 es codificado por el ADN del mutante triple K8D más L9S más Q10CaIL-1 β con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-76 representan el marcador His, los nucleótidos
10 76-171 representan el epítipo máximo CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 625-723 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), los nucleótidos 196A>G y 198G>T representan la mutación K8D, el nucleótido 200T>C y representa la mutación L9S, el aminoácido 10 se descartó por
15 comparación con la secuencia del Silvestre (Q10del).

El mutante No 13 es codificado por el ADN del mutante Y87SCaTNF- α con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 535-588 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), el
20 nucleótido 323A>C representa la mutación Y87S.

El mutante No 14 es codificado por el ADN del mutante Y119N CaTNF- α con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 535-588 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón
25 sin sentido), el nucleótido 418T>A representa la mutación Y119N.

El mutante No 15 es codificado por el ADN del mutante doble Y87S más Y119N CaTNF- α con marca CDV-F mínima. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 535-588 representan el epítipo mínimo CDV-F (17 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 323A>C representa la mutación Y87S, el nucleótido 418T>A representa la mutación Y119N.

El mutante No 16 es codificado por el ADN del mutante Y87S CaTNF- α con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 64-159 representan el epítipo máximo de CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 631-729 representan el epítipo máximo de CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 419A>C representa la mutación Y87S.

El mutante No 17 es codificado por el ADN del mutante Y119N CaTNF- α con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 64-159 representan el epítipo máximo de CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 631-726 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 514T>A representa la mutación Y119N.

El mutante No 18 es codificado por el ADN del mutante doble Y87S más Y119N CaTNF- α con marca CDV-F y CPV máxima. Los nucleótidos 1-63 representan el marcador His, los nucleótidos 64-159 representan el epítipo máximo de CPV (32 aminoácidos), los nucleótidos 631-726 representan el epítipo máximo CDV-F (32 amino ácidos + codón sin sentido), el nucleótido 419A>C

representa la mutación Y87S, el nucleótido 514T>A representa la mutación Y119N.

Adyuvantes para la vacuna. Los adyuvantes empleados son QuilA

(250 µg/ml en salina con buffer de fosfato 0.01 M, abreviada
5 como PBS, también llamada "salina"), Matrix C (125 µg/ml en PBS
0.01 M) y Microsol (emulsión aceite en agua al 25%). QuilA es
una saponina adyuvante muy conocida, que se aísla de la corteza
del árbol suramericano Quillaja saponaria Molina (Familia
Rosaceae). Puede obtenerse en Biolang, KalveHave, Dinamarca o
10 en Roth, Karlsruhe, Alemania. Matrix C (complejo
inmunoestimulante o ISCOM) es un adyuvante para vacuna que
contiene saponina, colesterol y fosfolípido (fosfatidilcolina),
el cual forma estructuras tipo jaula que característicamente
tienen 40 nm diámetro. Puede obtenerse en CSL, Melbourne,
15 Australia o Isconova, Uppsala, Suecia. Microsol es una
emulsión de aceite en agua que se compone de pequeñas gotitas
de aceite mineral (típicamente por debajo de 1µm) (Marcol 52 de
ExxonMobil) en agua, que se estabiliza empleando detergente
Tween 80 al 1% (polioxietileno (20) sorbitan monooleato),
20 disponible en Acros Organics.

Diseño Experimental.

Para los experimentos con las citoquinas bioactivas (wt)
"solas", el diseño es como sigue. Cinco grupos de perros Beagle
convencionales de cuatro meses de edad se vacunaron s.c. en el
25 flanco derecho con 1.0 ml de las formulaciones según se indica
en la Tabla 1.

J-L-L

Tabla 1. Configuración para la vacunación experimental en perros.

	N	Antígeno	adyuvante
1	4	—	Ninguno: PBS
2	5	50 µg Ca-N-His-IL-1β-CDV + 5 µg Ca-N-His-TNF-α-CDV	QuilA
3	5	50µg Ca-N-His-IL-1β-CDV + 5 µg Ca-N-His-TNFα-CDV	Matrix C
4	5	50 µg Ca-N-His-IL-1β-CDV + 5 µg Ca-N-His-TNFα-CDV	Microsol
5	5	50 µg Eq-N-His-IL-1β + 5 µg Eq-N-His-TNF-α	QuilA o PBS

5 A las 4, 8, 20 y 24 semanas después de la primera vacunación los perros recibieron una vacuna de refuerzo de 1.0 ml (s.c. en el flanco derecho). Se tomaron muestras de sangre a las semanas T=0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 después de la primera vacunación. Los sueros se usaron para (1) determinar los niveles de anticuerpos contra las IL-1β y TNF-α empleando ELISAs específicas para antígeno; (2) para análisis de Western blot; y (3) para verificar los anticuerpos neutralizantes.

Para los experimentos con citoquinas bioactivas mezcladas (wt)/citoquinas bioinactivas (mt), el diseño es el siguiente.

15 Seis grupos de perros Beagle convencionales de 15 a 18 semanas de edad se vacunaron s.c. en el flanco derecho con 1.0 ml de las formulaciones que se indican en la Tabla 1A. En este experimento una proteína mutante CaIL-1β (mutante No. 4: mutante C7S CaIL-1β con marcación CDV-F mínima) y una proteína

20 mutante CaTNF-α (mutante 13: mutante Y87S CaTNF-α con marcación mínima CDF-V) se analizaron como antígeno de proteína única o combinada.

Tabla 1A. Configuración para la vacunación experimental en perros.

	N	Antígeno	adyuvante	inyección i.a. de
1	4	—	Nada: PBS	NaCl
2	4	—	Nada: PBS	Urato
3	4	50 µg wt Ca-N-His-IL-1β-CDV-Fmin	Microsol	Urato
4	4	50 µg wt Ca-N-His-IL-1β-CDV-Fmin 5 µg	Microsol	Urato
5	4	50 µg mt Ca-N-His-IL-1β-C7S-CDV-Fmin	Microsol	Urato
6	4	50 µg mt Ca-N-His-IL-1β-C7S-CDV-Fmin 5	Microsol	Urato
N-His=Marcador His N-terminal; wt= Tipo silvestre; mt=mutante; min= mínimo; i.a.= intraarticular				

5 A las semanas 4, 8, 11, 14 y 16 después de la primera vacunación los perros recibieron una vacuna de refuerzo de de 1.0 ml (s.c. en el flanco derecho). Se tomaron muestras de sangre a las semanas T=0, 4, 8, 11, 14, 16, y 17 después de la primera vacunación. Los sueros se usaron para (1) determinar los niveles

10 de anticuerpos contra las IL-1β y TNF-α empleando ELISAs específicas para antígeno (aproximación por captación en sánduche).

Análisis por ELISA y Western blot. Los análisis por ELISA se llevaron a cabo empleando procedimientos estándar. Para esto,

15 se usaron un anticuerpo captador policlonal IL-1β anticanino de cabra y un anticuerpo captador monoclonal TNF-α anticanino de ratón para recubrir placas de microtitulación de 96 celdas. Luego se agregó a las placas CaIL-1β marcado con C-terminal His (C-His) o CaTNF-α marcado con C-His seguido subsecuentemente por

series de diluciones de sueros de los perros. La unión de los anticuerpos específicos de anti-IL-1 β o anti-TNF- α se detectó usando un anticuerpo policlonal anticanino de conejo IgG (H+L) marcado con HRP.

- 5 **Bioensayo para la Inhibición de IL-1 β TNF- α .** Para medir la inhibición se empleó una línea celular informadora de luciferasa NIH-3T3 NF κ B que responde a IL-1 β y a TNF- α . Se pre-incubaron sueros de perro combinados, tomados en varios momentos, con 10 ng/ml de proteínas de Ca y Eq IL-1 β y TNF- α Ca y Eq y se
- 10 verificó la neutralización, i.e. inhibición de la actividad de unión al receptor. La inhibición de la actividad de IL-1 β o TNF- α por los anticuerpos se cuantificó en Unidades Relativas de Luz (RLU).

B. Configuración de un modelo de OA inducida por

15 cristales de urato en perros Beagle

- Diseño Experimental.** Se usó el modelo para la osteoartritis inducida por cristales de urato (ver i.a. Bonneau et al; Revue Med. Vet., 2005, **156**, 4, 179 - 181). A dos grupos de 4 perros Beagle convencionales (aprox. 5 meses de edad) se les inyectó
- 20 intra-articularmente en una articulación de la rodilla (de la pata posterior) con 1.0 ml de NaCl al 0.9% (grupo de control) o con 1.0 ml de cristales de urato, 10 mg/ml en NaCl al 0.9% (grupo del modelo de OA). Las inyecciones intraarticulares de 1.0 ml de solución se hicieron bajo anestesia general. A las T
- 25 = 0, 1 h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h y 96h después de la inyección se calificó para cada perro individual el

comportamiento general, cojera (calificada de pie y al caminar), dolor al palpar y efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción). Al terminar el experimento se fueron sometidos a eutanasia los perros y a las rodillas se les
5 practicó examen macroscópico en presencia de un patólogo.

Cristales de Urato. Una solución de cristales de urato de 10 mg/ml (Sigma ítem nr. U2875; batch nr. 120K5305) en solución de NaCl al 0.9% se empleó para la inyección intraarticular. Para esto, se prepare una solución de 22 g de cristales de urato en
10 NaCl al 0.9%, con una concentración de 50 mg/g. Esta solución se llevó al sonicador hasta que se obtuvo una suspensión con partículas $\leq 50 \mu\text{m}$ (examen al microscopio). Luego de confirmar por la imagen microscópica que las partículas tenían un tamaño $\leq 50 \mu\text{m}$, se diluyeron 20 g de la suspensión a 100 g con NaCl al
15 0.9% (concentración final 10 mg/ml). El pH se ajustó a pH 7.0 y la suspensión se llevó al autoclave. También se verificó, por imagen microscópica de la suspensión, el tamaño de cristal (debería ser $\leq 50 \mu\text{m}$) inmediatamente antes y después del autoclave. Después de la preparación, la suspensión se almacenó
20 a 2-8°C para su uso posterior.

Identificación. Los perros se enumeraron individualmente (por tatuaje) en la oreja.

Alojamiento. Los perros se alojaron individualmente en perreras regulares en condiciones naturales no restringidas, tuvieron
25 posibilidades para ejercicio en el exterior, y recibieron agua ad libitum. Alimento en trozos estuvo disponible en cantidad limitada.

Tabla 2. Agrupamiento y dosificación.

gr	No	Elemento para prueba
1	4	1,0 ml NaCl al 0,9%
2	4	1,0 ml de cristales de urato 10 mg/ml en NaCl al 0,9%

Inyección de NaCl al 0.9% . A los 4 animales del grupo 1 (grupo de control) se les inyectó intraarticularmente 1.0 ml de NaCl al 0.9%, bajo anestesia general, en 1 articulación de rodilla (pierna trasera izquierda rasurada).

Inyección de cristales de urato. A los 4 animales del grupo 2 (grupo del modelo OA) se les inyectó intraarticularmente 1.0 ml de cristales de urato, 10 mg/ml, en NaCl al 0.9%, bajo anestesia general, (pierna trasera izquierda afeitada).

Procedimientos y parámetros experimentales.

Observación. A las T =0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h y 96h después de la inyección se calificó para cada perro individual el comportamiento general, cojera (calificada de pie y al caminar), dolor a la palpación y efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción). Los perros se observaron y calificaron primero en sus perreras, subsecuentemente durante al caminar y finalmente de pie, en una tabla para observaciones.

Calificación para Efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción) en comparación con la articulación no inyectada:

0: Sin efusión de la articulación (ligamento patelar diferenciado palpable).

1: Efusión leve (llenado sinovial mínimo con ligamento perceptible).

5 2: Efusión moderada (llenado sinovial obvio con ligamento no diferenciado).

3: Efusión severa (sin ligamento palpable).

C. Configuración de un modelo para OA inducida por cristal de urato en ponis Shetland

10 **Diseño del experimento** Usamos el mismo modelo de osteoartritis en ponis. Dos grupos de 2 ponis Shetland convencionales (con aproximadamente 12 meses de edad) fueron inyectados intra articularmente en una articulación de la rodilla (pata trasera derecha) o con 5,0 ml de Na Cl al 0,9%

15 (grupo de control) o con 5,0 ml de cristales de urato de 10 mg/ml (grupo del modelo OA). Las inyecciones intra articulares de 5,0 ml de solución se realizaron bajo ligera sedación. A las T = 0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h, y 96h después de la inyección cada poni se calificó individualmente

20 en cuanto a su comportamiento general, cojera (calificación de pie y al caminar), dolor a la palpación y efusión de la rodilla (tumefacción). Al final del experimento los ponis fueron sometidos a eutanasia y las rodillas fueron examinadas macroscópicamente por un patólogo.

25 **Cristales de Urato.** Véase la sección B.

Identificación. Los ponis shetland fueron identificados por un chip implantado y una gargantilla numerada.

Alojamiento. Los ponis, alojados individualmente en cubículos de establo bajo circunstancias naturales no restringidas, recibieron heno y agua *ad libitum*, había disponibles trozos de alimento en cantidad limitada.

Tabla 3. Agrupación y dosificación.

gr	N	Elemento para la Prueba
1	2	5,0 ml de NaCl al 0,9%
2	2	5,0 ml cristales de urato 10mg/ml en NaCl al 0,9%

Inyección de NaCl al 0,9%. Los 2 animales del grupo 1 (grupo de control) fueron inyectados intra articularmente con 5,0 ml de NaCl al 0,9% bajo ligera sedación en 1 articulación de la rodilla (pata trasera derecha rasurada)

Inyección de cristales de urato. Los 2 animales del grupo 2 (grupo del modelo OA) fueron inyectados intra articularmente con 5,0 ml de cristales de urato 10mg/ml en NaCl 0,9% bajo ligera sedación en 1 articulación de la rodilla (pata trasera derecha rasurada).

Procedimientos y parámetros del experimento.

Observación. Cada poni se calificó individualmente a las T = 0, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 30h, 48h, 72h, y 96h después de la inyección en cuanto a su comportamiento general, cojera

(calificación de pie y caminando), dolor a la palpación y efusión de la rodilla (tumefacción).

Los ponis se observaron y calificaron en sus cubículos del establo y subsecuentemente mientras caminaban en el pasillo.

5 **Calificación para la cojera:**

Calificación al permanecer de pie

0: Permanece normalmente de pie con soporte total del peso.

1: Posición anormal con soporte parcial del peso.

2: Posición anormal sin soporte del peso (poni en 3 patas)

10 3: Reacio a levantarse.

Calificación al caminar

0: Camina normalmente con soporte total del peso.

1: Ligera cojera con soporte parcial del peso.

2: Cojera obvia con soporte parcial intermitente del peso.

15 3: Sin soporte del peso (poni en 3 patas)

4: Reacio a caminar.

Calificación a la palpación.

0: Sin signos de dolor

1: Dolor de suave a moderado (permite la palpación pero
20 volteando la cabeza o retrocede, vocalización, depresión).

2: Dolor severo (no permite al examinante palpar la articulación).

Calificación para efusión (tumefacción) de la articulación de la rodilla en comparación con la articulación no inyectada:

0: Sin efusión de la articulación (ligamento patelar discernible palpable).

1: Efusión leve (llenado sinovial mínimo con ligamento discernible).

2: Efusión moderada (llenado sinovial obvio con ligamento no discernible).

3: Efusión severa (sin ligamento palpable).

D. Prevención de los síntomas de OA en los perros Beagle vacunados profilácticamente contra IL-1 β y TNF- α

Diseño experimental para la vacunación. En el estudio A,

para experimentos con "solo wt", los perros fueron vacunados a las T=0, T=4, T=8, T=20, y T=24 semanas posteriores a la vacuna con IL- β y TNF- α formuladas con varios inmunopotenciadores distintos por grupo (véase la tabla 1). Para el presente estudio esos perros fueron revacunados dos veces 24 semanas después de la última vacunación, i.e. a la T=48 y T=54 semanas después de la primera vacuna, con 1,0 ml (s.c. en el flanco derecho) de la formulación de la vacuna como se indica en la tabla 4. Se tomaron muestras de sangre para serología a las T=48, T=54, T=58 semanas después de la primera vacuna. Los sueros fueron usados para determinar los niveles de anticuerpos

contra IL-1 β y TNF- α usando ELISA para antígenos específicos y procedimientos estándar.

Tabla 4. Configuración para la vacunación experimental en perros, continuación de la tabla 1

gr.	N	Antígeno	adyuvante	Animal No
1	6	--	Ninguno: PBS	223-381-384-834- 892-924
2	4	50 μ g Ca-N-His-IL-1 β -CDV 5 μ g Ca-N-His-TNF- α -CDV	QuilA	8757-9140-8751-8759
3	5	50 μ g Ca-N-His-IL-1 β -CDV 5 μ g Ca-N-His-TNF- α -CDV	Microsol	8749-9146-9126-8747- 8761
4	5	50 μ g Eq-N-His-IL-1 β 5 μ g Eq-N-His-TNF- α	ninguno: PBS	8755-9134-8763-8753-9144

5

Para los experimentos con mezclas wt/mt se usó la vacunación experimental como se describió en la Tabla 1A.

Inducción de la OA. Para los experimentos con solamente wt, una (1) semana después de ser tomada la última muestra de sangre (T = 59) los perros del grupo 1 (grupo de control con PBS) fueron separados en 2 nuevos grupos (n = 2 y N = 4). Todos los perros de los 5 grupos, aproximadamente de 18 meses de edad en ese momento, fueron inyectados intraarticularmente en 1 articulación de la rodilla (pata trasera) o con 1,0 ml de NaCl al 0,9% (Grupo de control 1) o con 1,0 ml de cristales de urato a 10mg/ml en NaCl al 0,9% (grupos 2-5 del modelo OA). La

10

15

inyección intraarticular de 1.0ml de solución se realizó bajo anestesia general. A las T = 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 32h, 48h, 72h, y 96h después de la inyección se calificó, para cada perro individualmente, el comportamiento general, la cojera (puntuada de pie y al caminar), el dolor a la palpación y la efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción). Al final del experimento los perros fueron sometidos a eutanasia y las rodillas fueron examinadas macroscópicamente en presencia de un patólogo.

10 **Tabla 5. Configuración para la inducción de OA en los perros vacunados.**

gr-	N	Elemento Probado	Animal No.
1	2	1.0ml NaCl al 0,9%	223 - 381 (anterior grupo 1 de la Tabla 4)
2	4	1.0 ml de cristales de urato 10 mg/ml en NaCl al 0,9%	384 - 834 - 892 - 924 (anterior grupo 1 de la Tabla 4)
3	4	1.0 ml de cristales de urato 10 mg/ml en NaCl al 0,9%	8757-9140-8751 -8759 (anterior grupo 2 de la Tabla 4)
4	5	1.0 ml de cristales de urato 10 mg/ml en NaCl al 0,9%	8749-9146-9126-8747- 8761 (anterior grupo 3 de la Tabla 4)

gr-	N	Elemento Probado	Animal No.
5	5	1.0 ml de cristales de urato 10 mg/ml en NaCl al 0,9%	8755-9134-8763-8753- 9144 (anterior grupo 4 de la Tabla 4)

Para los experimentos con mezcla wt/mt, se hizo la configuración de la inducción de OA como se describió en la Tabla 1A.

5 **Calificación para la Cojera: véase la sección B.**

Análisis estadístico. Se llevó a cabo la comparación del promedio de los valores de la calificación usando el análisis de varianza (ANOVA) con diferencia significativa mínima (L.S.D.) como prueba de comparación múltiple. Se generaron
10 todos los resultados usando el programa para computador SAS Enterprise Guide 2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de
confidencia de 95% (P<0,05).

15 **2 RESULTADOS**

A. Inducción de anticuerpos contra las IL-1 β y TNF- α propias en perros.

Efectos colaterales que resultan de la vacunación
20 **(experimentos wt solamente).** Después de la vacunación

primaria (primo) fueron visibles reacciones locales (en piel) en los perros que recibieron las proteínas Eq en QuilA. En las vacunas de refuerzo subsecuentes reemplazamos QuilA por PBS en este grupo de vacunación (véase también la Tabla 1). Poco después de la primera vacuna de refuerzo la mayoría de los perros de los grupos 2 (proteínas Ca en QuilA), 3 (proteínas Ca en Matrix-C) y 4 (proteínas Ca en Microsol) se enfermaron, posiblemente a causa de la presencia de altas concentraciones de TNF- α bioactiva (libre) en la formulación de la vacuna. Esos agudos efectos colaterales sistémicos se evitaron en las subsecuentes vacunas de refuerzo por reducción de la cantidad de TNF- α , para ambas proteínas: Ca y Eq, de 50 μ g/dosis/perro a 5 μ g/dosis/perro.

Efectos colaterales que resultan de la vacunación

(experimentos con mezcla de wt/mt). Después de la vacunación primaria (primo) fueron visibles reacciones locales (en piel) en la mayoría de los perros que recibieron el adyuvante Microsol (grupos 3-6). Después de la primera vacuna y las vacunas subsecuentes (refuerzos) las reacciones locales fueron menos prominentes. No se observaron efectos colaterales sistémicos agudos a las concentraciones usadas de proteína CaIL-1 β y CaTNF- α .

Títulos de anticuerpos contra CaIL-1 β y CaTNF- α

(experimentos con wt solamente). Como lo representaron las Figuras 1A-D se pueden generar títulos de anticuerpos significativos por ELISA contra las moléculas de CaIL-1 β y CaTNF- α propias. Es claro por estas gráficas que los

anticuerpos son de reacción cruzada, i.e. los anticuerpos cultivados contra las proteínas Ca reconocen las proteínas Eq y viceversa. Es digno de mención que los anticuerpos cultivados contra CaTNF- α reconozcan EqTNF- α a un título más alto (debido posiblemente a afinidad/especificidad) que a la proteína CaTNF- α , particularmente en los puntos de los primeros tiempos (**Figuras 1C y 1D**). En general los más altos títulos de anticuerpos en conjunto se generaron en perros vacunados con las proteínas Ca cuando se comparan con las correspondientes contrapartes de Eq. Doce semanas después de la primera (post primo) vacunación los grupos 1 y 3 se retiraron del experimento debido a limitaciones de alojamiento. En resumen, puede concluirse que usando moléculas propias caninas modificadas genéticamente o proteínas equinas heterólogas, es posible quebrar la tolerancia inmunológica hacia las moléculas propias e inducir altos títulos de anticuerpos. Es notorio que se obtuvieron resultados comparables con las citoquinas mutantes.

Análisis Western blot. Se realizaron análisis Western blot para confirmar la especificidad de los anticuerpos anti IL-1 β y anti TNF- α usando proteínas marcadas con CDV y no marcadas. Los Western blot se incubaron con suero de T=9 semanas después de la primera (post primo) vacuna. Como se describe en la **Figura 2** todos los anticuerpos tuvieron reacción cruzada con las proteínas Ca y Eq IL-1 β y TNF- α . Se usó como control y no fue reconocida por los anticuerpos una proteína de pollo no relacionada IL-18(ChIL-18) expresada por E. Coli purificado por el marcador His.

Neutralización de la capacidad de los anticuerpos anti IL-

1 β y anti TNF- α .

Aunque se indujeron en perros altos títulos de anticuerpos contra IL-1 β y TNF- α , no era claro si esos anticuerpos serían capaces de neutralizar la bioactividad de las proteínas correspondientes. Para esto usamos una línea celular informadora de la luciferasa NIH-3T3 NF κ B sensible a IL-1 β y TNF- α . Se preincubaron Ca y Eq IL-1 β y TNF- α con sueros combinados de varios momentos y probados para neutralización, i. e. inhibición de la actividad de unión al receptor. De los resultados representados en las Figuras 3A y 3b puede concluirse que la combinación de sueros de 24 semanas después de la primera (post primo) vacuna contienen la mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes de anti CaIL-1 β y de anti EqTNF- α . La bioactividad, medida en Unidades de Luz Relativa (RLU), de CaIL-1 β y de EqTNF- α se reduce dramáticamente cuando se compara con los otros sueros. Este también es el caso, aunque menos prominentemente, para inhibidores de la bioactividad de CaTNF- α y EqTNF- α (Figuras 3C y 3D). Sueros combinados de 6 semanas y 9 semanas más 12 semanas después de la primera (post primo) vacuna contienen pocos anticuerpos de IL-1 β neutralizantes pero significativos anticuerpos de TNF- α neutralizantes

Conclusión

En conclusión hemos proporcionado evidencia clara de que se puede cultivar anticuerpos por inmunización activa contra

moléculas del tipo silvestre con marcación mínima de CDV y moléculas propias de CaIL-1 β y CaTNF- α mutantes.

B. Configuración del modelo para OA inducida por cristales de urato en perros Beagle

- 5 **Inyección de fluido en la articulación de la rodilla.** En general, la inyección de 1,0 ml de NaCl al 0,9% o 1,0 ml de cristales de urato 10mg/ml en NaCl al 0,9% en la articulación fue realizada sin efectos colaterales serios.

- Valoración clínica: calificación de la cojera.** Los animales
- 10 inyectados con los cristales de urato mostraron, dentro de las 2 siguientes horas después de la inyección, cojera manifiesta tanto al caminar como de pie, (véase la **Figura 4**). Dos perros se recuperaron completamente dentro de 24 horas mientras que los otros 2 perros sufrieron por los cristales de urato hasta
- 15 el final del experimento. Los resultados del examen macroscópico de las articulaciones de la rodilla de los perros sometidos a eutanasia revelaron que esos 2 perros tenían una luxación de la rótula (anormalidad anatómica de la articulación). Esta luxación de la rótula en combinación con la
- 20 inyección de solución de cristales de urato lo más probablemente resultó en el prolongado periodo de incomodidad antes mencionado. En el grupo de perros inyectados con solución de NaCl al 0,9% solamente 1 perro sufrió por un periodo más bien corto desde la inyección (visible a las T = 8h). En el
- 25 examen macroscópico de la articulación de la rodilla de este perro se hizo claro que este animal también tenía luxación de la rótula.

Valoración clínica: Dolor a la palpación y efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción).

También se monitoreó el dolor a la palpación y la efusión de la articulación de la rodilla. Como puede verse en la **Figura 5** los SEMs (errores estándar del promedio) son grandes indicando que realmente hay alguna variación individual entre los perros. Entre las 2 y 8 horas después de la inyección de los cristales de urato el dolor a la palpación es medible con un máximo entre las 4 y las 6 horas. La efusión de la articulación de la rodilla es un poco demorada comparado con el dolor a la palpación y comienza 4 horas después de la inyección con un máximo a las 8 horas.

Valoración clínica: patología de la rodilla. Al final del experimento todos los perros fueron sometidos a eutanasia y las rodillas fueron examinadas macroscópicamente. En todos los perros no se encontraron trazas de la solución de la inyección. Solamente en 1 perro el sitio de la inyección fue aún visible. En la rodilla de 3 perros una cantidad grande de fluido fue visible. Probó que esos 3 perros tenían luxación de la rótula.

Conclusión

El modelo para artritis aplicado en perros por inyección intraarticular de una solución que contenía cristales de urato en 1 articulación de rodilla (pata trasera) es rápido (efectos visibles dentro de las 2 siguientes horas), efímero (de horas a 1-2 días) y reversible. Los parámetros relevantes para monitorear el proceso incluyen calificación de la cojera al caminar y de pie, el dolor a la palpación y la efusión de la

articulación. La temperatura corporal y la temperatura de la rodilla no son parámetros relevantes en este modelo.

C. Configuración del modelo para OA inducida con cristales de urato en ponis Shetland

- 5 **Inyección de fluido en la articulación de la rodilla.** En general, la inyección de 5,0 ml de NaCl al 0,9% o 5,0 ml de cristales de urato 10mg/ml en NaCl al 0,9% en la articulación de la rodilla se realizó sin efectos colaterales serios.

- Valoración Clínica: calificación de la cojera.** Los poni
10 inyectados con los cristales de urato mostraron cojera manifiesta, tanto al caminar, como en pie, dentro de las dos horas siguientes a la inyección (véase la **FIGURA 6**). Se calificó el malestar máximo entre las 6 y las 8 horas después de la inyección. Los dos poni de control no mostraron signos de
15 cojera.

- Valoración clínica: Dolor a la palpación y efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción).** El dolor a la palpación y la efusión de la articulación de la rodilla también fueron monitoreados. Como puede verse en la **Figura 7A** el dolor
20 fue calificado dentro de las 2 siguientes horas después de la inyección mientras la efusión de la rodilla (**FIGURA 7B**) fue detectable en una etapa posterior (> 48 horas). Como no se incrementó la efusión de la articulación de la rodilla entre las 72 y las 96 horas, esto pudo indicar que la tumefacción
25 alcanzó un máximo a las 96 horas.

Valoración clínica: patología de la rodilla. Al final del experimento todos los ponis fueron sometidos a eutanasia y las rodillas fueron examinadas macroscópicamente. No pudieron encontrarse trazas de la solución de la inyección en todos los ponis. El examen macroscópico de las articulaciones de la rodilla de los ponis inyectados con urato mostró una cantidad incrementada de fluido sinovial amarillo, engrosamiento de la membrana sinovial con edema y hemorragia. Los controles no mostraron una patología.

10 **Conclusión**

El modelo de artritis aplicado en ponis por inyección intraarticular de una solución que contenía cristales de urato en 1 articulación de la rodilla (pierna trasera derecha) es, como también lo mostramos en perros, rápido (los efectos son visibles dentro de las 2 siguientes horas), efímero (horas a 1-2 días) y reversible cuando se califica la cojera y el dolor. La efusión de la rodilla (tumefacción) es palpable iniciándose a las 48 horas después de la inyección y parece alcanzar un máximo entre las 72 y las 96 horas.

20 **D. Prevención de los síntomas de OA en los perros**

Beagle vacunados profilácticamente contra IL-1 β y TNF- α

Títulos de anticuerpos contra IL-1 β y TNF- α después de la revacunación.

Como se representó en las Figuras 8A-D (experimentos solamente con wt) los títulos de anticuerpos globales a las T = 48 semanas post vacunación i.e. 24 semanas

después de la vacuna de refuerzo, se mantuvieron en un nivel bastante alto. La revacunación de los perros produjo un incremento moderado en el título de anticuerpos por todos los antígenos analizados y por todos los grupos.

5 **Valoración clínica: calificación del malestar.** Se

representan en la **Figura 9** (experimentos solamente con wt) los puntajes de malestar para "de pie" (**Figura 9B**), "al caminar" (**Figura 9C**), "dolor a la palpación" (**Figura 9D**), "efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción)" (**Figura 9E**) y

10 "puntaje clínico total" que es el promedio de todos los puntajes del malestar medidos (**Figura 9A**). De todas las figuras es claro que los perros no vacunados mostraron malestar manifiesto dentro de las 2 siguientes horas a la inyección. Los perros vacunados mostraron, en varios casos significativamente,
15 malestar reducido o de moderado a suave. Como puede verse en las figuras los puntajes del malestar para los perros vacunados fueron significativamente menores y mostraron una demora cuando se comparan con los perros no vacunados.

Valoración clínica: patología de la rodilla. Al final del
20 experimento todos los perros fueron sometidos a eutanasia y las rodillas fueron examinadas macroscópicamente por un patólogo. En general, excepto por lo perros de control con NaCl, en todos apareció la membrana sinovial engrosada y rojiza. Cerca a ella, en todas las rodillas, se detectó una pequeña cantidad de
25 fluido mucoso.

Valoración clínica: calificación del malestar. En la **Figura**

10 (experimentos con mezcla de wt/mt) los puntajes para el

malestar "de pie" (**Figura 10Aa**) y "al caminar" (**Figura 10B**) son representados en los periodos de las 6 y a las 8 horas después de la inyección de urato intraarticular. De estas figuras es claro que los perros no vacunados (grupo de control de urato) mostraron malestar manifiesto a las 6 horas y a las 8 horas después de la inyección. Los perros vacunados mostraron, en varios casos significativamente, malestar reducido o de moderado a suave. Como puede verse en la **Figura 10** los puntajes del malestar para los perros vacunados fueron significativamente menores cuando se comparan con los perros no vacunados (grupo de control del urato). También es claro, especialmente a las 8 horas después de la inyección que la vacuna con solo la CaIL-1 β de tipo silvestre o solamente la CaIL-1 β del mutante reduce el malestar cuando se compara con los perros de control del urato no vacunados.

Conclusión

De los resultados obtenidos de este experimento podemos concluir que es posible inducir anticuerpos contra las moléculas propias IL-1 β y TNF- α , con base en el uso citoquinas del tipo silvestre o mutantes, y que esos anticuerpos, dirigidos solamente contra IL-1 β , o también contra la TNF- α pueden suprimir los síntomas de la artritis. También se puede concluir que los mejores resultados parecen obtenerse con una vacuna que se dirige contra ambos: IL-1 β y TNF- α .

E. Varios

Es de notar que con el uso de IL-1 β y TNF- α bioactivos, se han observado efectos colaterales agudos. Esos efectos colaterales pueden prevenirse usando versiones bioinactivas de esas citoquinas, por ejemplo como las conocidas por la patente Estadounidense 6,093,405. Podrían escogerse citoquinas parcialmente inactivadas para obtener un balance entre inmunogenicidad y bioactividad. Usamos el modelo de los cristales de urato para inducir OA. Es de notar que otros modelos para OA se conocen de la técnica precedente, por ejemplo el modelo de Transección del Ligamento Cruciado Anterior (ACLT descrito en Fleming et al; Curr Opin Orthop. 2005 Octubre; 16 (5): 354-362) o el modelo Groove (descrito en Masterbergen et al; Rheumatology, 2006; 45(4): 405-413). Dados los resultados positivos de los experimentos según se ha descrito en la presente solicitud, se cree que se obtendrán resultados correspondientes cuando se apliquen esos modelos en pacientes que sufran de OA o la estén desarrollando debido a causas naturales. Hemos mostrado un efecto significativo en el alivio para pacientes con OA cuando se vacunan con una combinación de IL-1 β y TNF- α o con derivados de las mismas. Esto se ha mostrado en los perros Beagle. Dados los resultados en este vertebrado, y la similitud en los procesos fisiológicos relativos a las articulaciones en el grupo de los vertebrados, en particular en los vertebrados mamíferos tales como perros, caballos y humanos, la actual invención puede ser usada en cualquier vertebrado, en particular en vertebrados mamíferos.

F. Descripción de las figuras

La figura 1 muestra las respuestas a los anticuerpos específicos de IL-1 β y TNF- α medidas en varios periodos después de la vacuna. Los perros fueron o no inmunizados (control salino), o inmunizados con proteínas de [CaIL-1 β y CaTNF- α] (abreviadas con Ca) formuladas en QuilA, Matrix C, o Microsol, o inmunizados con proteínas de [EqIL-1 β y EqTNF- α] (abreviado con Eq) formuladas en QuilA (solamente la primera)/salina (los refuerzos). Los perros recibieron una vacuna de refuerzo a las 4, 8, 20, y 24 semanas después de la primera vacuna. Se midieron los anticuerpos usando ELISA para antígeno específico en el cual las proteínas se usaron sin marcador CDV; **[A]**. Los títulos de los anticuerpos medidos contra CaIL-1 β ; **[B]**. Los títulos de anticuerpos medidos contra EqIL-1 β ; **[C]**. Los títulos de anticuerpos medidos contra CaTNF- α ; **[D]**. Los títulos de anticuerpos medidos contra EqTNF- α . T = semanas después de la primera vacuna.

La figura 2 muestra un análisis Western blot de proteínas EqIL-1 β y EqTNF- α y, CaIL-1 β y CaTNF- α marcadas y sin marcar con CDV. Las proteínas, 1 μ g/línea, se analizaron por Nu-PAGE al 4-12% y Western blot usando sueros de 1 perro de cada grupo de vacunación a las 9 semanas después de la primera vacunación. **[A]**. Gel coloreado con Coomassie; **[B]**. Western blot incubado con suero de control; **[C]**. Western blot incubado con suero de un perro vacunado con [CaIL-1 β y CaTNF- α] formulado con adyuvante de QuilA; **[D]**. Western blot incubado con suero de un perro vacunado con [CaIL-1 β y CaTNF- α] formulado con adyuvante de matrix C; **[E]**. Western blot incubado con suero de un perro

vacunado con [CaIL-1 β y CaTNF- α] formulado con adyuvante de Microsol; [F]. Western blot incubado con suero de un perro vacunado con [CaIL-1 β y CaTNF- α] formulado con adyuvante de QuilA (solo la primera)/salina (los refuerzos).

- 5 La figura 3 muestra la inhibición de la activación de NF κ B por sueros de los perros vacunados inducida por IL-1 β o TNF- α . Diez ng/ml de [A] CaIL-1 β , [B] EqIL-1 β , [C] CaTNF- α , o [D] EqTNF- α fueron mezclados con diluciones de sueros con anticuerpos de perros vacunados con [CaIL-1 β y CaTNF- α] e incubados con
- 10 células informadoras NIH-3T3. La inhibición de la actividad de IL-1 β o TNF- α por los anticuerpos se cuantificó en Unidades de Luz Relativas (RLU). **T = 6 semanas:** estos son sueros combinados de perros de los grupos 2+3+4 (véase la tabla 1) tomados 6 semanas después de la primera vacunación. **T = 9+12 semanas:**
- 15 estos son sueros combinados de perros de los grupos 2+3+4 (véase la tabla 1) tomados 9 y 12 semanas después de la primera vacunación. **T = 24 semanas:** estos son sueros combinados de perros de los grupos 2+4 (véase la tabla 1) tomados 24 semanas después de la primera vacunación.
- 20 La figura 4 muestra los puntajes promedio para: de pie [A] y al caminar [B], y el promedio total de los puntajes de la cojera [C] (de pie + al caminar) para los perros Beagle. Los datos se expresaron como el promedio geométrico $\pm$ SEM.

La figura 5 muestra los puntajes promedio para el dolor a la

25 palpación [A] y los puntajes promedio para la efusión de la

articulación de la rodilla **[B]** para perros Beagle. Los datos se expresaron como el promedio geométrico $\pm$ SEM.

La figura 6 muestra los puntajes promedio para: de pie **[A]** y al caminar **[B]**, y el promedio del total de los puntajes para la cojera **[C]** (de pie + al caminar) para ponis Shetland. Los datos se expresaron como el promedio geométrico $\pm$ SEM. La flecha en el eje vertical izquierdo indica el máximo puntaje para el parámetro indicado.

La figura 7 muestra los puntajes promedio para el dolor a la palpación **[A]** y los puntajes promedio para la efusión de la articulación de la rodilla **[B]**. La figura 7 **[C]** muestra el puntaje clínico total (de pie + al caminar + dolor + tumefacción) para ponis Shetland. Los datos se expresaron como el promedio geométrico $\pm$ SEM. La flecha en el eje vertical izquierdo indica el máximo puntaje para el parámetro indicado.

La figura 8 muestra las respuestas a los anticuerpos específicos de IL-1 β y TNF- α medidas en varios periodos después de la primera vacunación. Los perros fueron o no vacunados (control salino) o revacunados a las T = 48 y T = 54 semanas después de la primera vacunación con proteínas de [CaIL-1 β + CaTNF- α marcadas con CDV] (abreviado con Ca) formuladas en QuilA o Microsol o revacunados con proteínas de [EqIL-1 β + EqTNF- α] (abreviado con Eq) formuladas en QuilA (solamente la primera) o salina (los refuerzos). Los anticuerpos se midieron a las T = 48, T = 54 y T = 58 semanas después de la primera vacunación usando ELISA específico para antígenos en los cuales las proteínas fueron usadas sin el marcador CDV. **[A]** los

títulos de los anticuerpos medidos contra CaIL-1 β ; **[B]** los títulos de los anticuerpos medidos contra EqIL-1 β ; **[C]** los títulos de los anticuerpos medidos contra CaTNF- α ; **[D]** los títulos de los anticuerpos medidos contra EqTNF- α . ★ =

5 significativamente diferente ($P < 0,05$) para el grupo salino;

↕↕ significativamente diferente ($P < 0,05$) entre los grupos indicados. T = semanas después de la primera vacunación.

La figura 9 muestra el promedio de la calificación clínica total para los perros Beagle. La figura 9 **[A]** da el puntaje clínico total (de pie + al caminar + dolor + tumefacción). La

10 figura 9 **[B]** da el puntaje promedio de: de pie. EL de al caminar se muestra en **[C]** y el de dolor a la palpación en **[D]**, el de la efusión de la articulación de la rodilla (tumefacción) en **[E]**. Los datos se expresaron como el promedio geométrico $\pm$

15 SEM.

★ = significativamente diferente ($P < 0,05$) para el grupo de control de los cristales de urato en el momento indicado; ↕↕ significativamente diferente ($P < 0,05$) entre los grupos indicados.

20 La figura 10 muestra el puntaje clínico promedio para los perros Beagle. **[A]** puntaje clínico promedio de: de pie; **[B]**. puntaje clínico promedio al caminar. Los datos se expresaron como el promedio geométrico $\pm$ SEM. ★ = significativamente diferente ($P < 0,05$) del grupo de control de cristales de urato

25 en el momento indicado.

REIVINDICACIONES

1. La vacuna para el tratamiento de la osteoartritis en vertebrados que comprende las citoquinas IL-1 β y opcionalmente de TNF- α o los derivados de las mismas, y en asociación con la dicha IL-1 β y la opcional TNF- α o los derivados de las mismas, una parte que no es propia con respecto a los vertebrados tal que la vacuna suscita una respuesta inmune en el vertebrado contra las moléculas propias IL-1 β y opcionalmente TNF- α de dicho vertebrado.
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las citoquinas IL-1 β y de TNF- α o los derivados de las mismas son homólogas con respecto al vertebrado que se trata.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde la parte que es no propia con respecto al vertebrado comprende un determinante antigénico derivado de un microorganismo.
4. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la parte que es no propia con respecto al vertebrado comprende un adyuvante.
5. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas tienen una bioactividad que es reducida cuando se las compara con las citoquinas IL-1 β y TNF- α propias del vertebrado.

6. El uso de las citoquinas IL-1 β y opcionalmente las TNF- α para producir una vacuna para el tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las
5 citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas son homólogos con respecto al vertebrado tratado.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas se asocian con un determinante antigénico derivado de un
10 microorganismo para producir la vacuna.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8, en donde las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas se asocia con un adyuvante para producir la vacuna.
- 15 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas tienen una bioactividad que es reducida cuando se les compara con las citoquinas IL-1 β y TNF- α propias del vertebrado.
- 20 11. El tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado por administración de una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

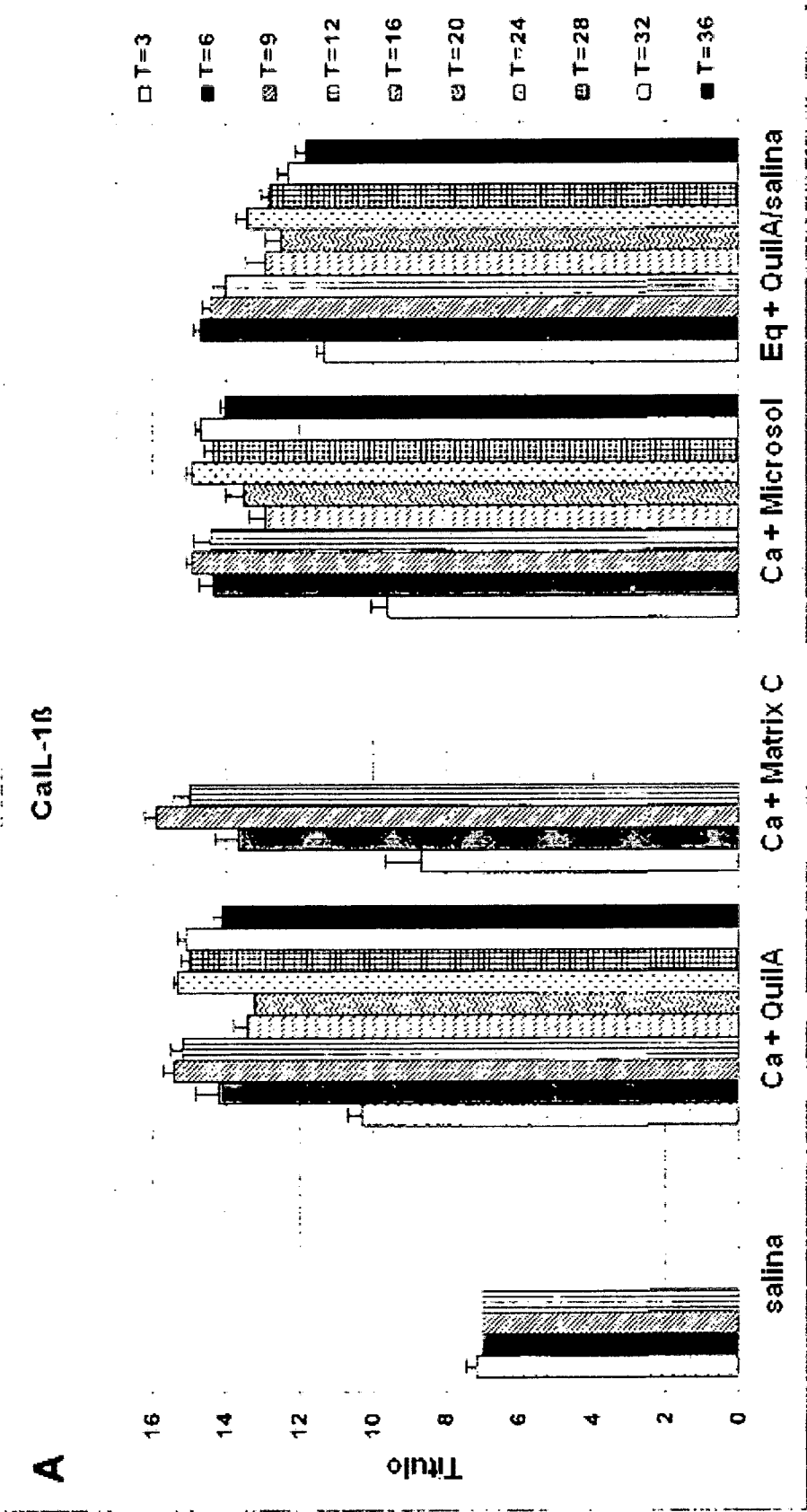


Figura 1

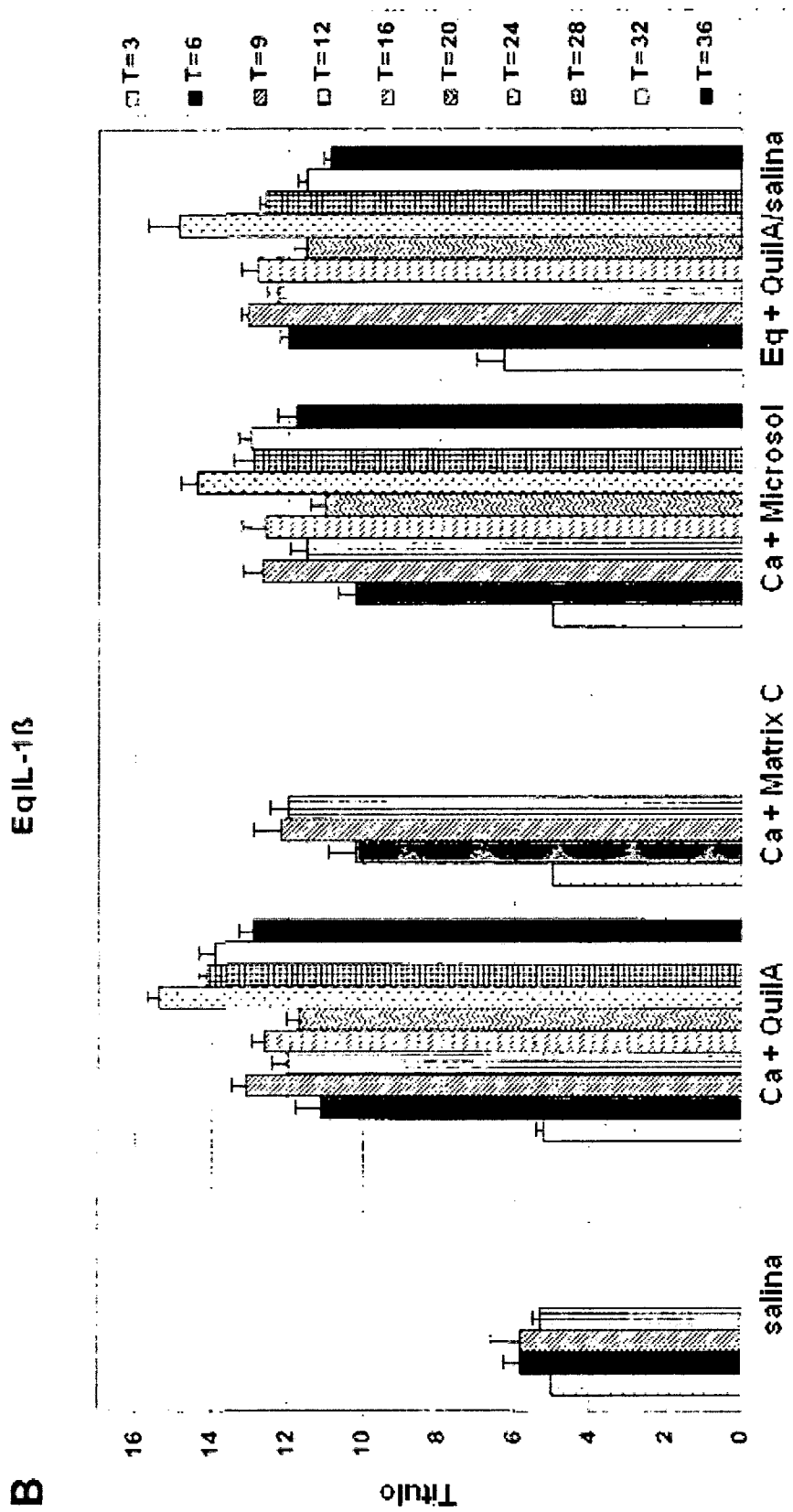


Figura 1 (continuación)

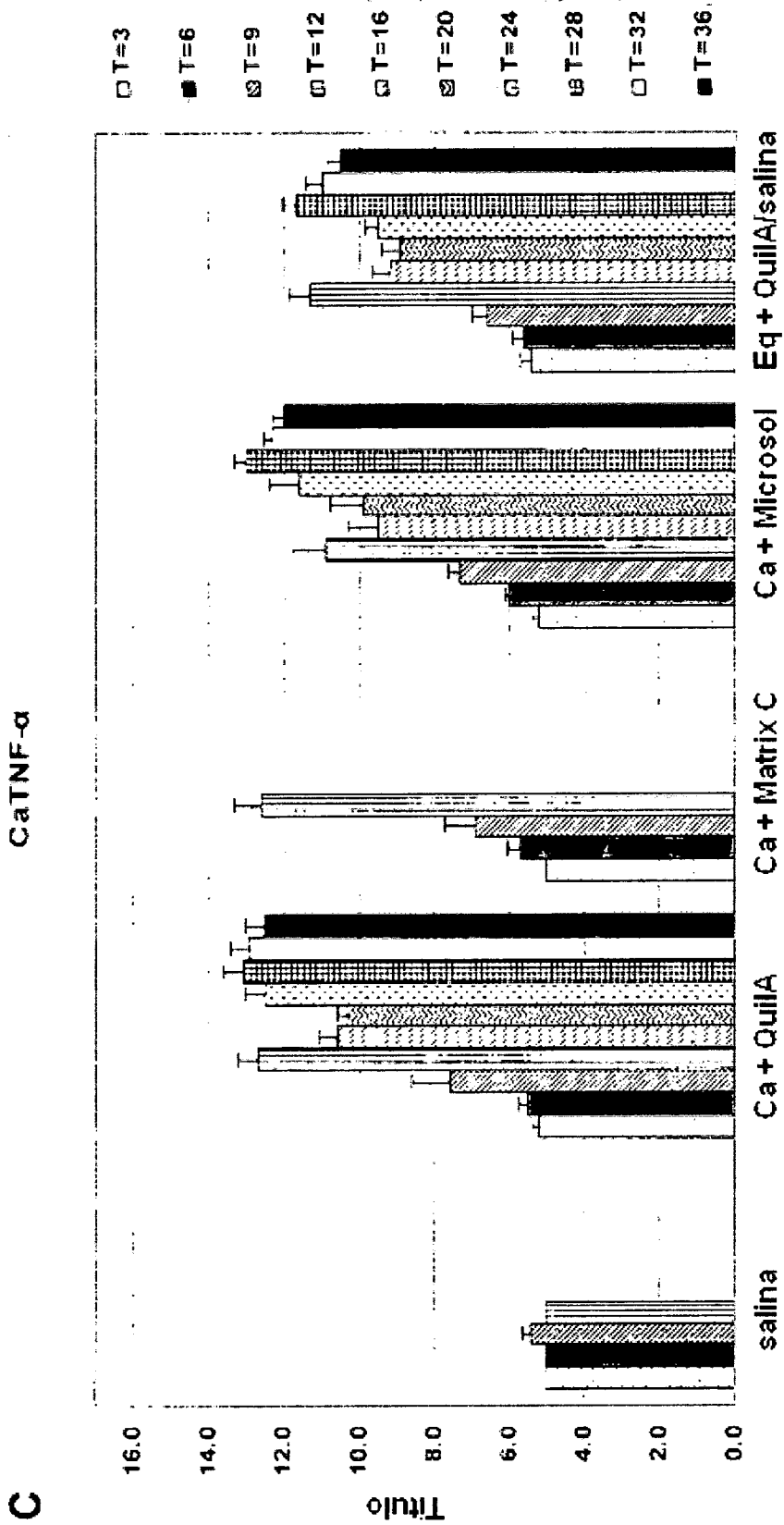


Figura 1 (continuación)

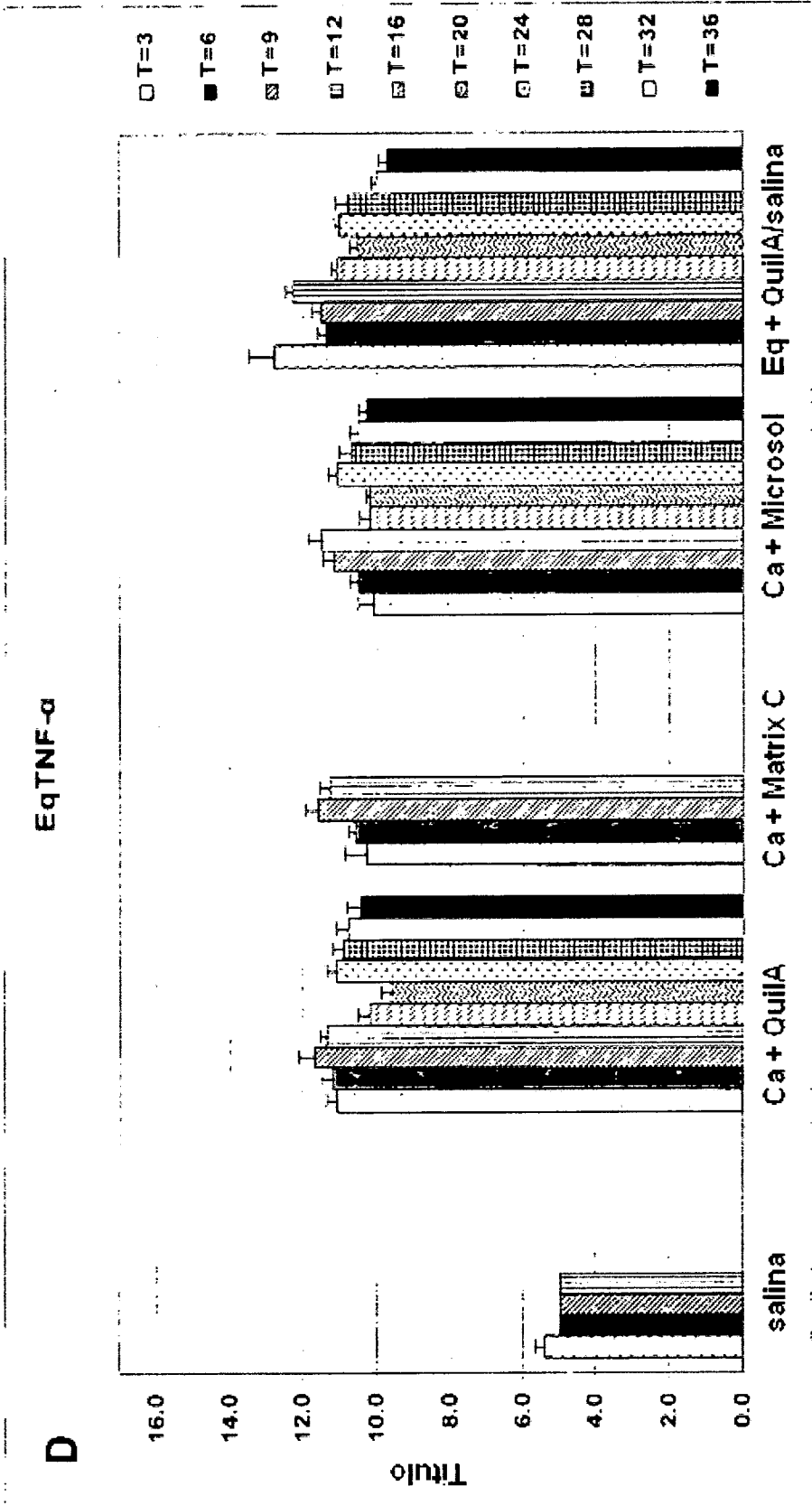


Figura 1 (continuación)

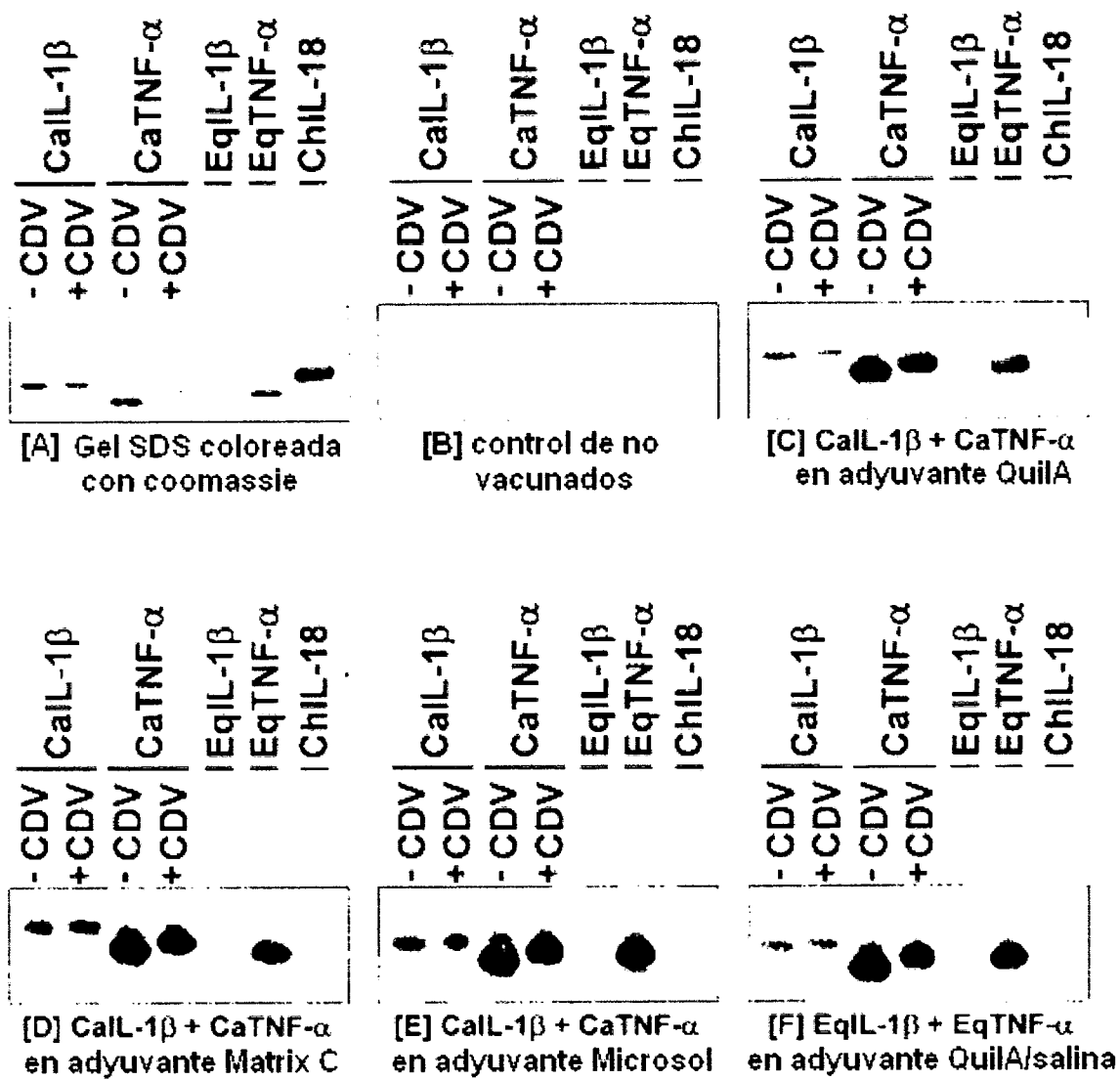


Figura 2

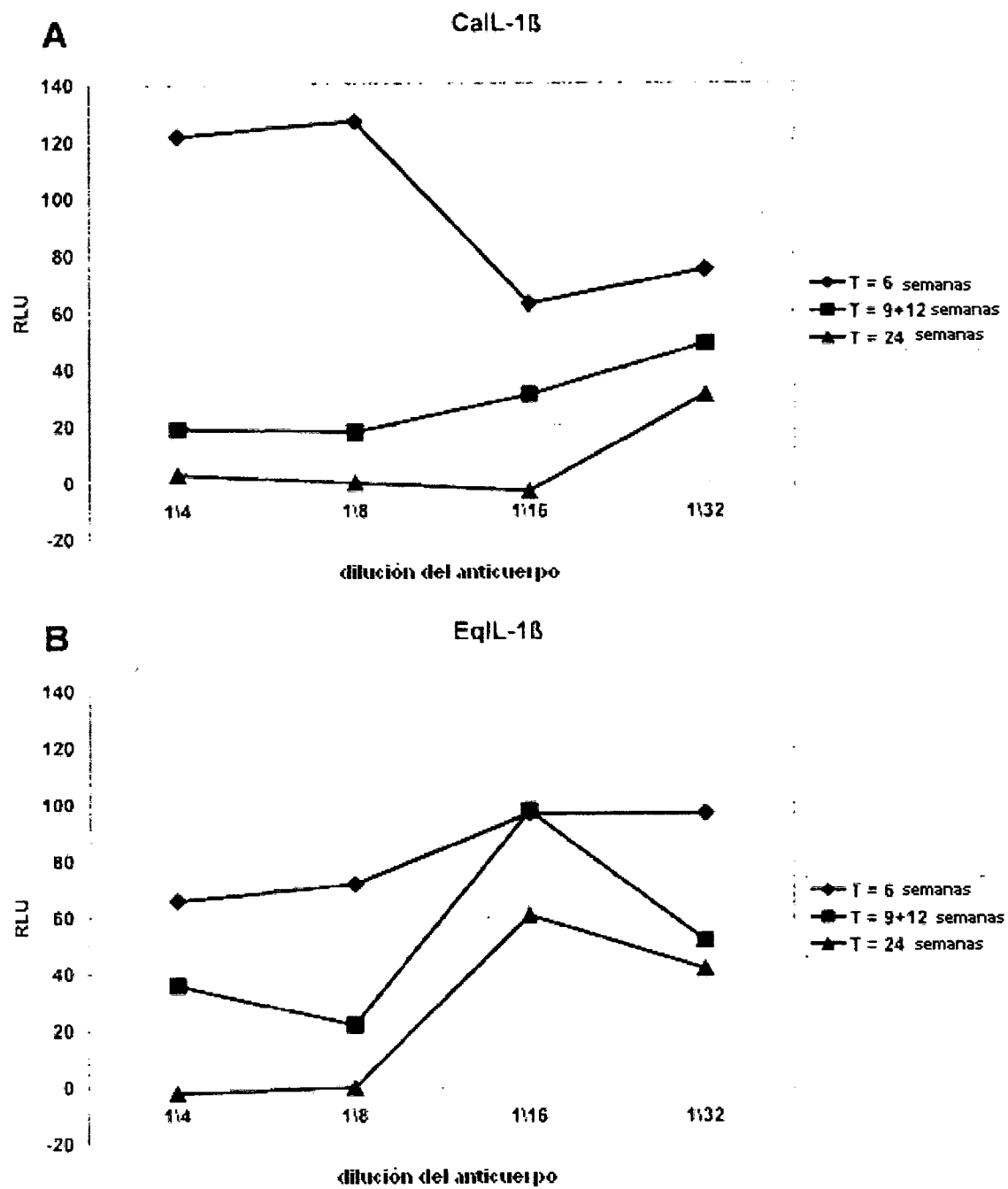


Figure 3

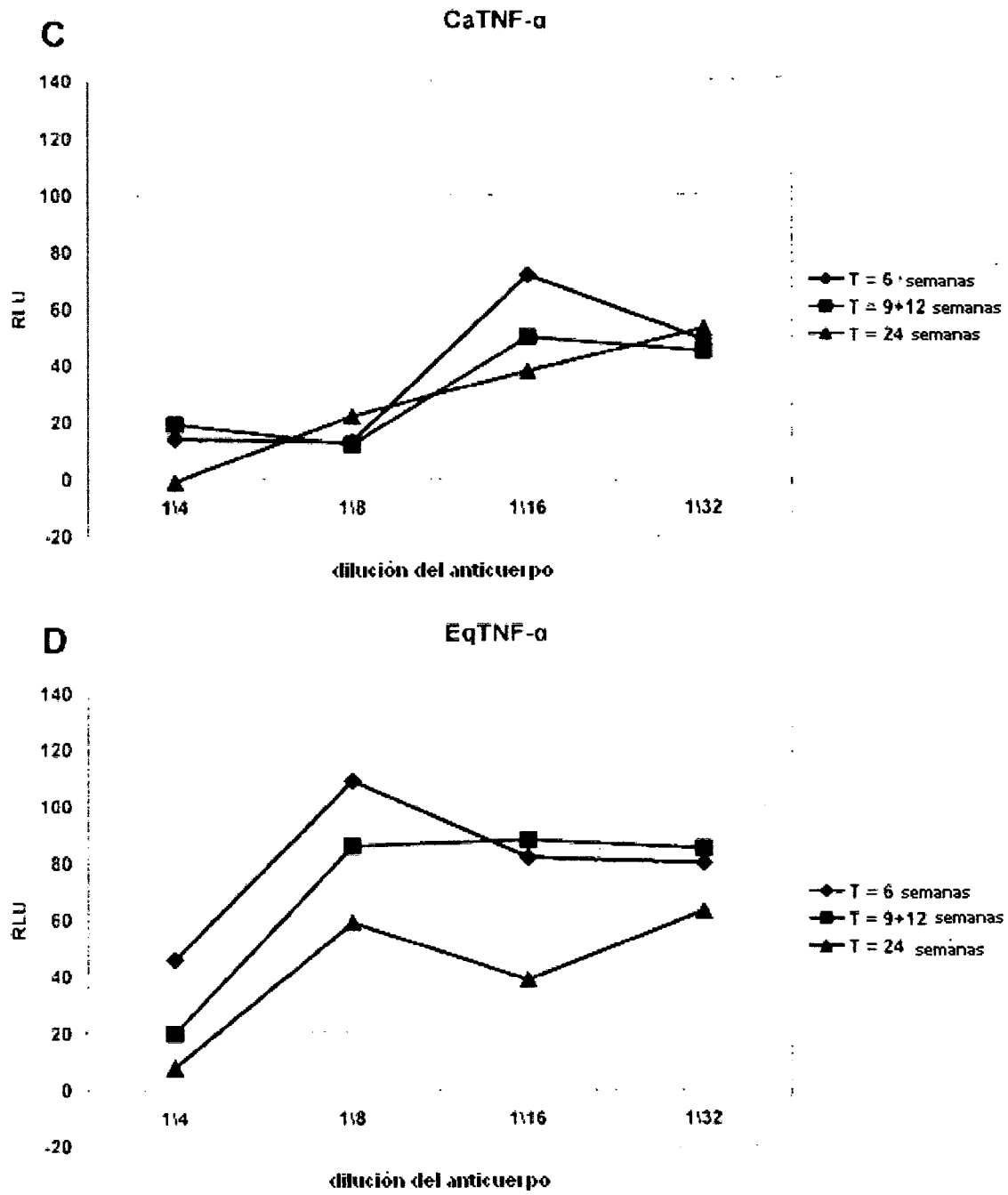


Figura 3 (continuación)

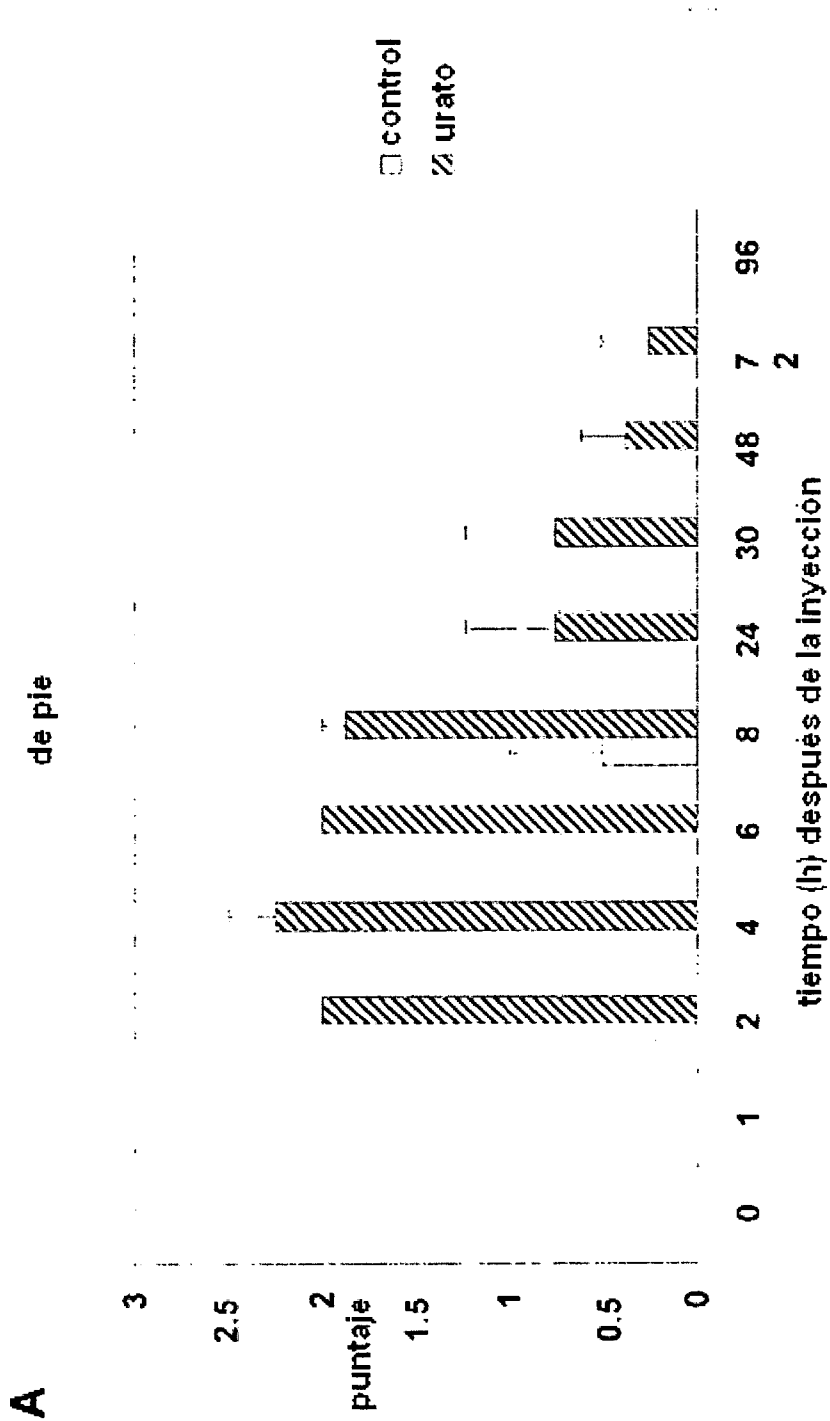


Figura 4

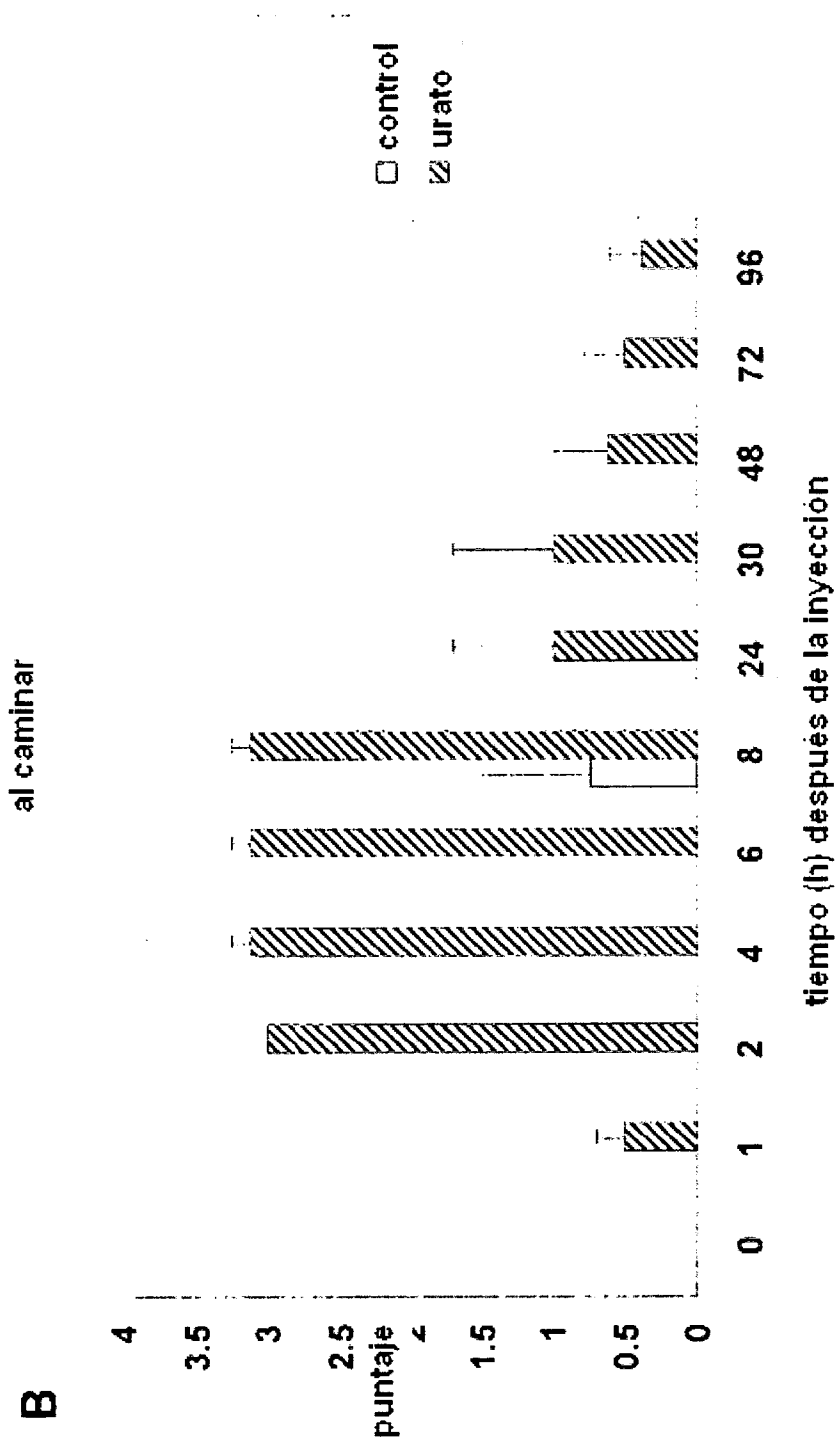


Figura 4 (continuación)

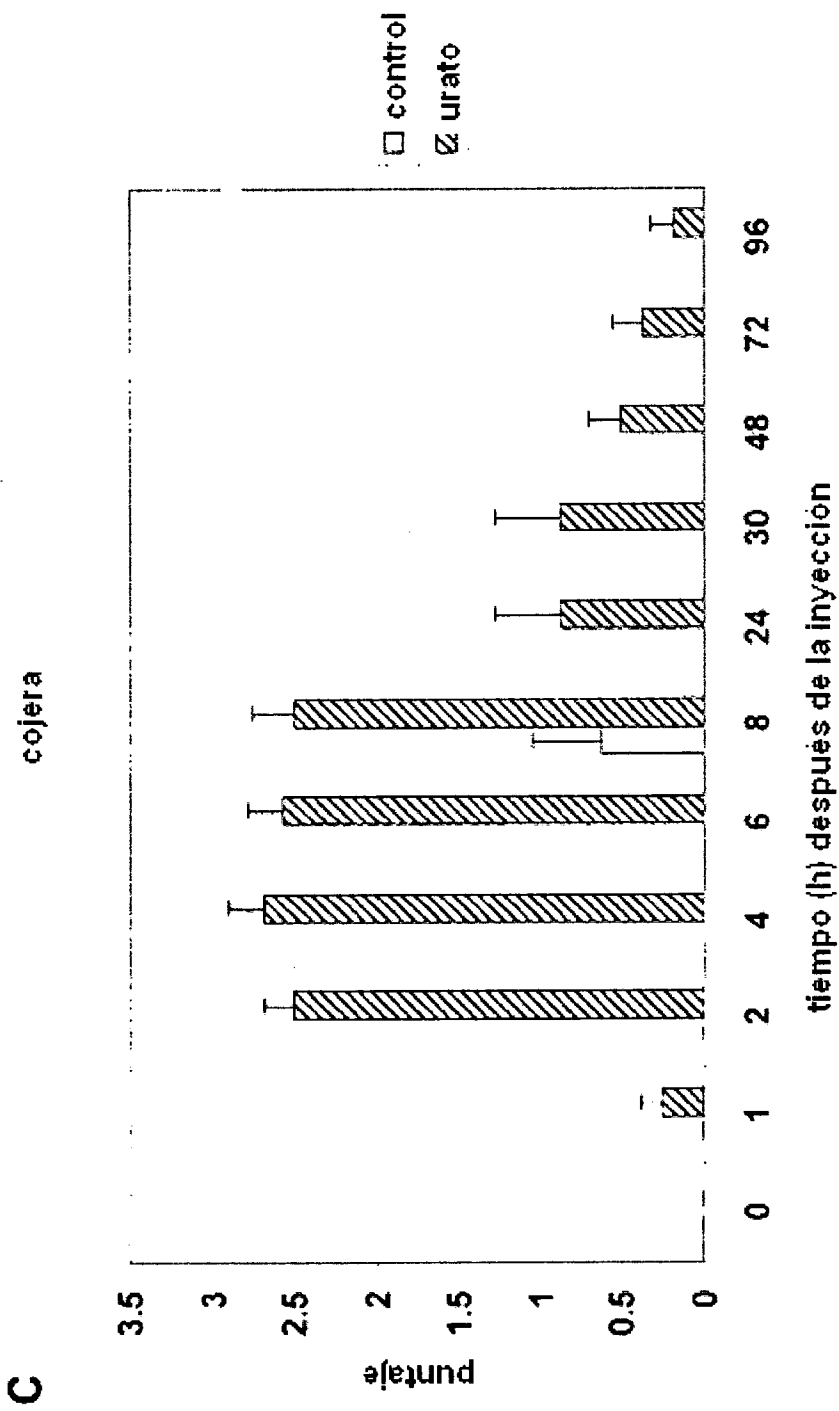


Figura 4 (continuación)

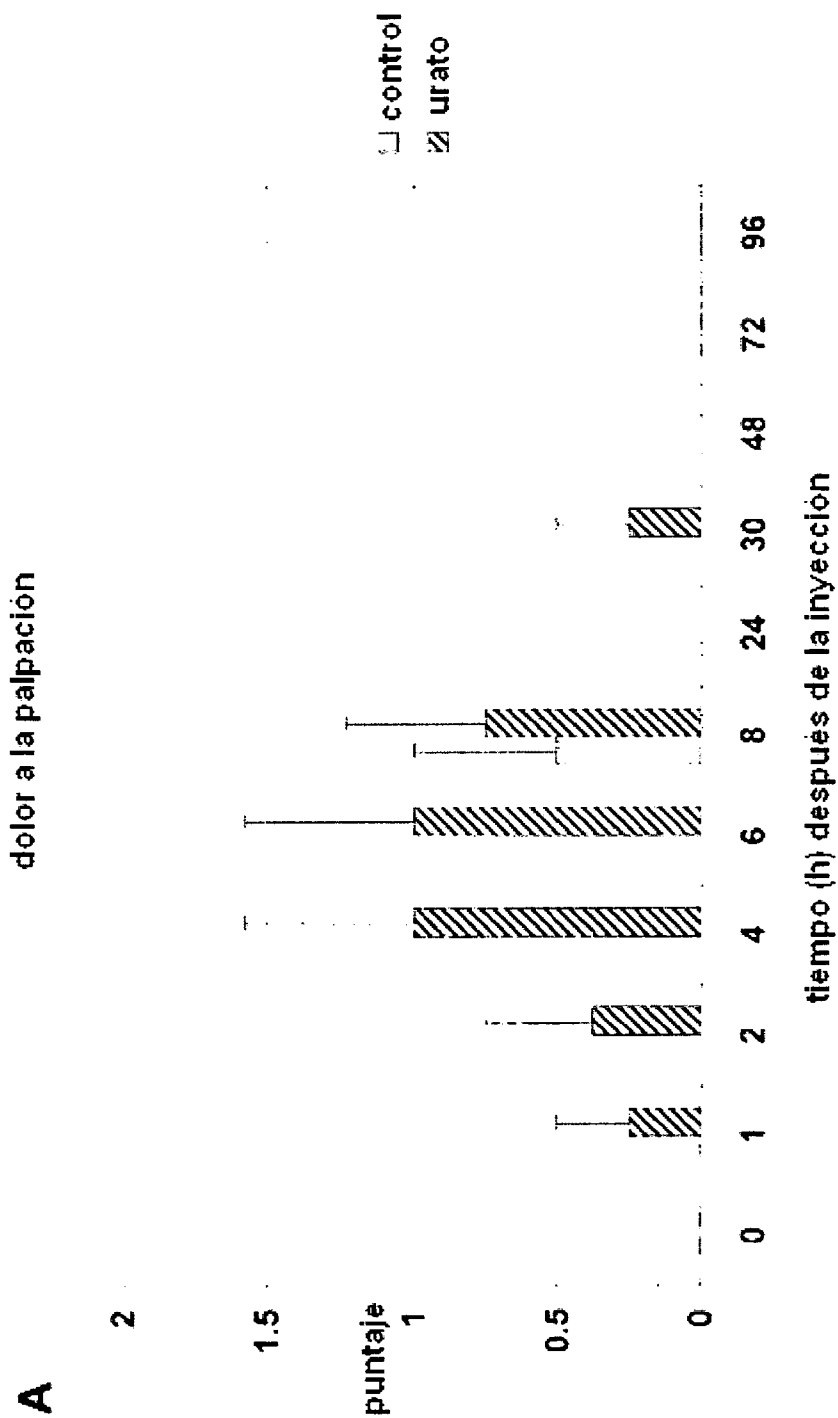


Figura 5

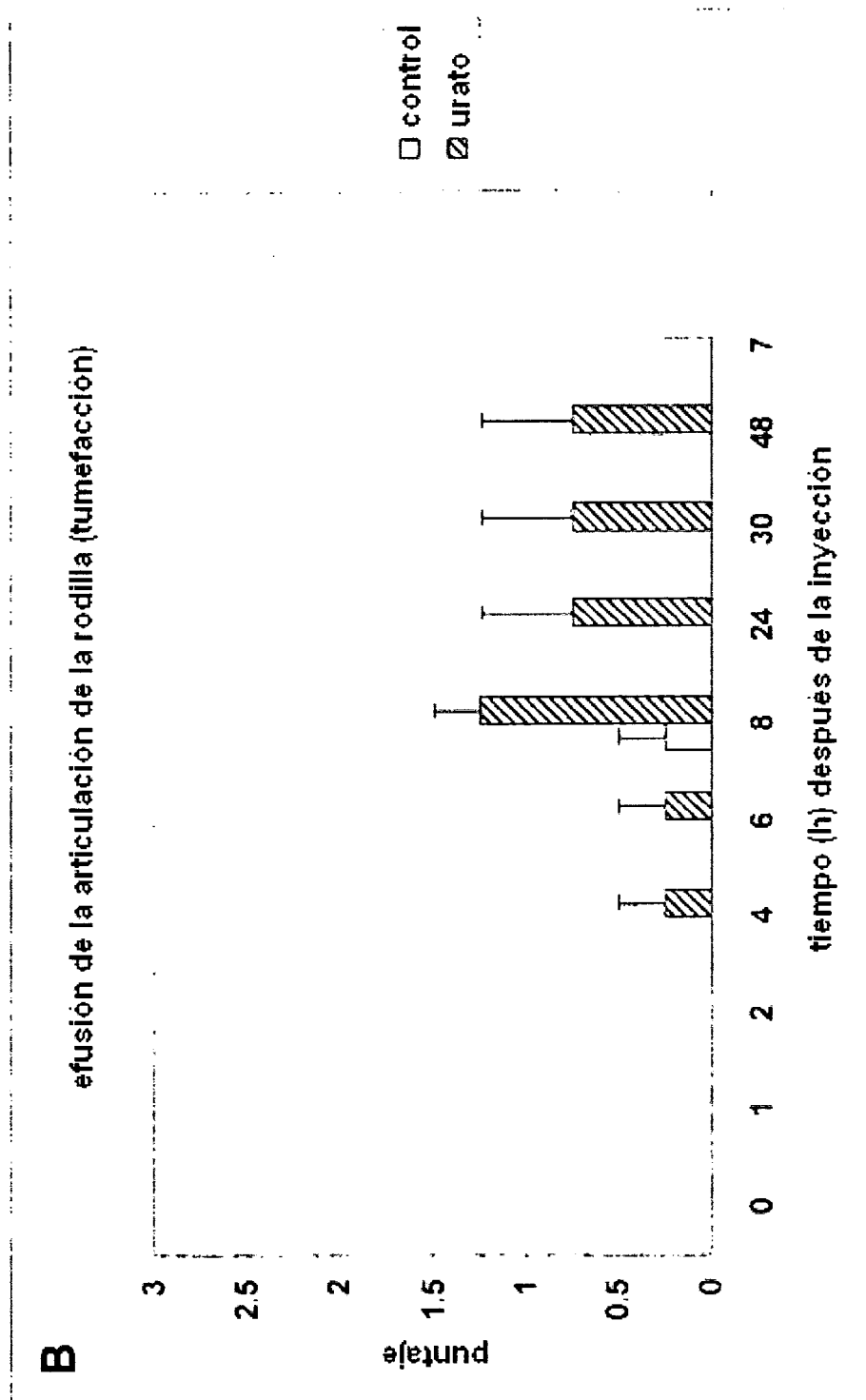


Figura 5 (continuación)

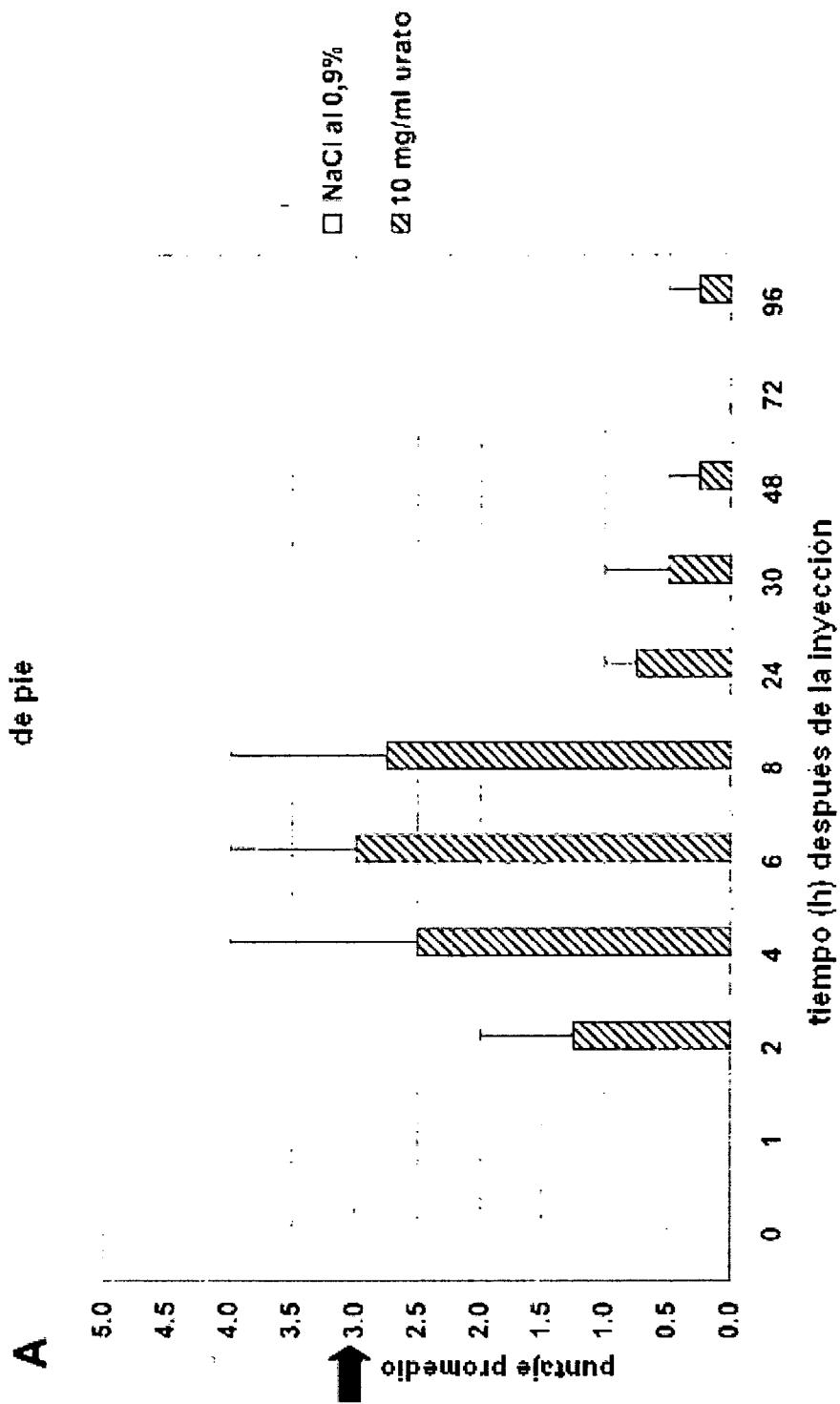


Figura 6

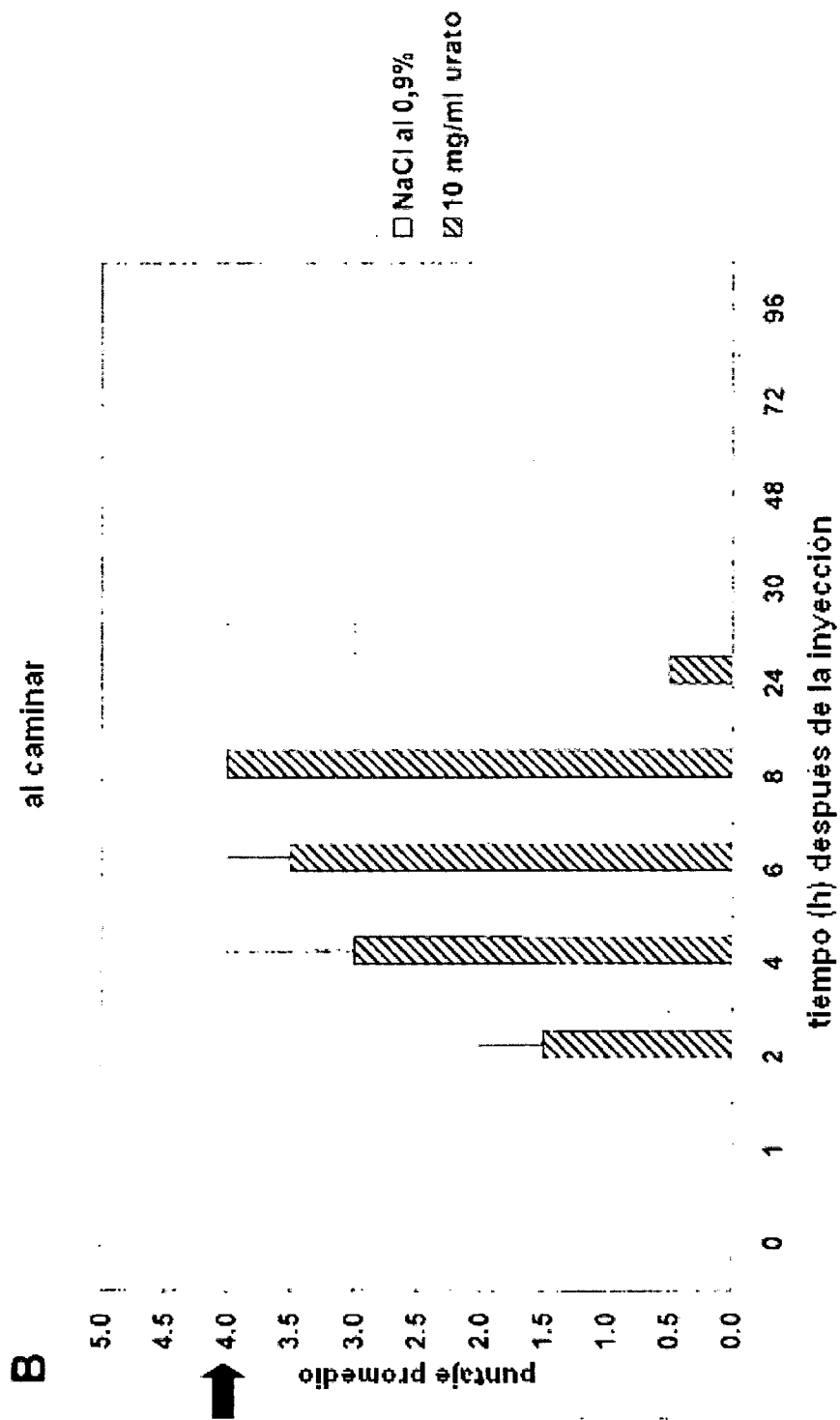


Figura 6 (continuación)

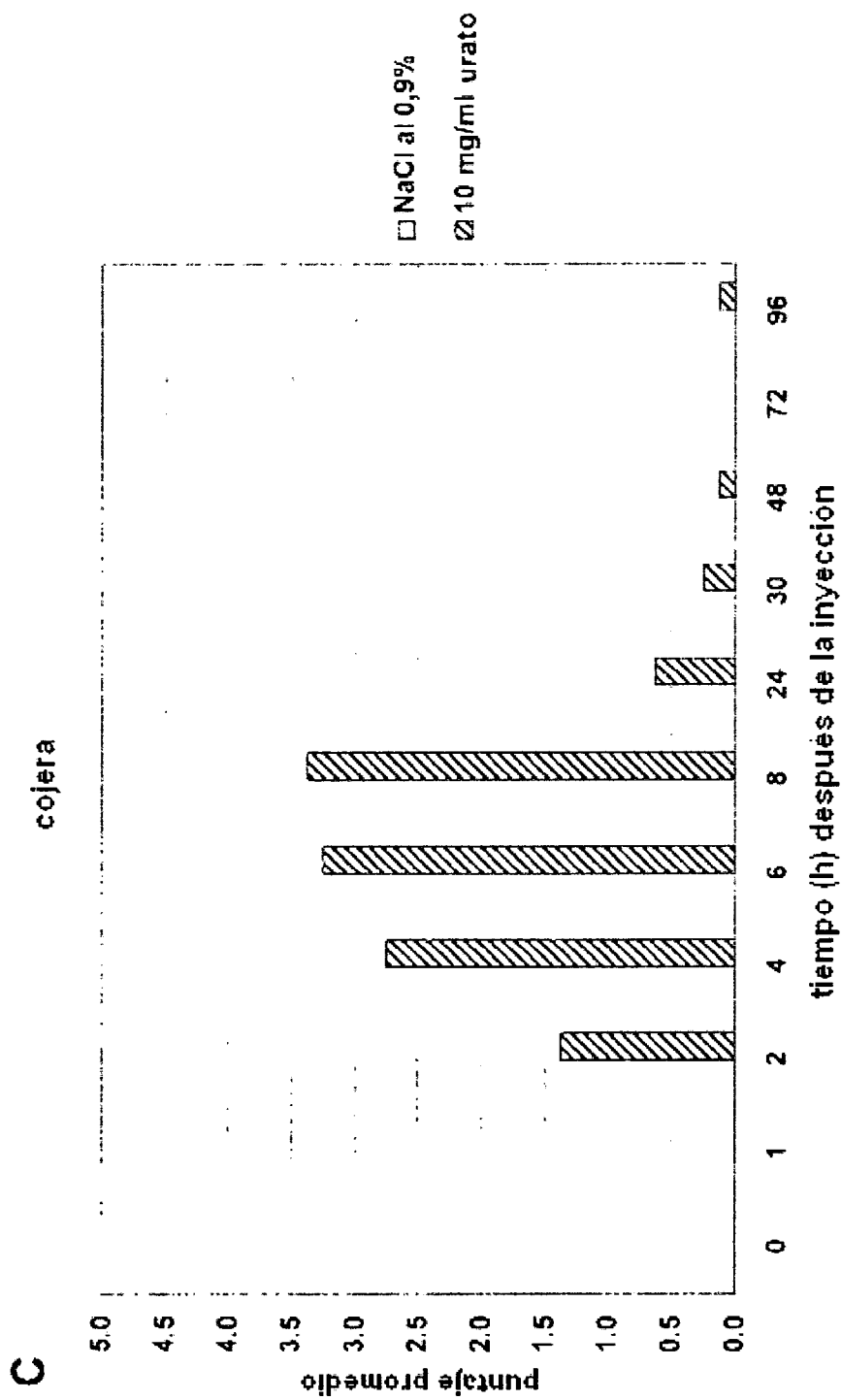


Figura 6 (continuación)

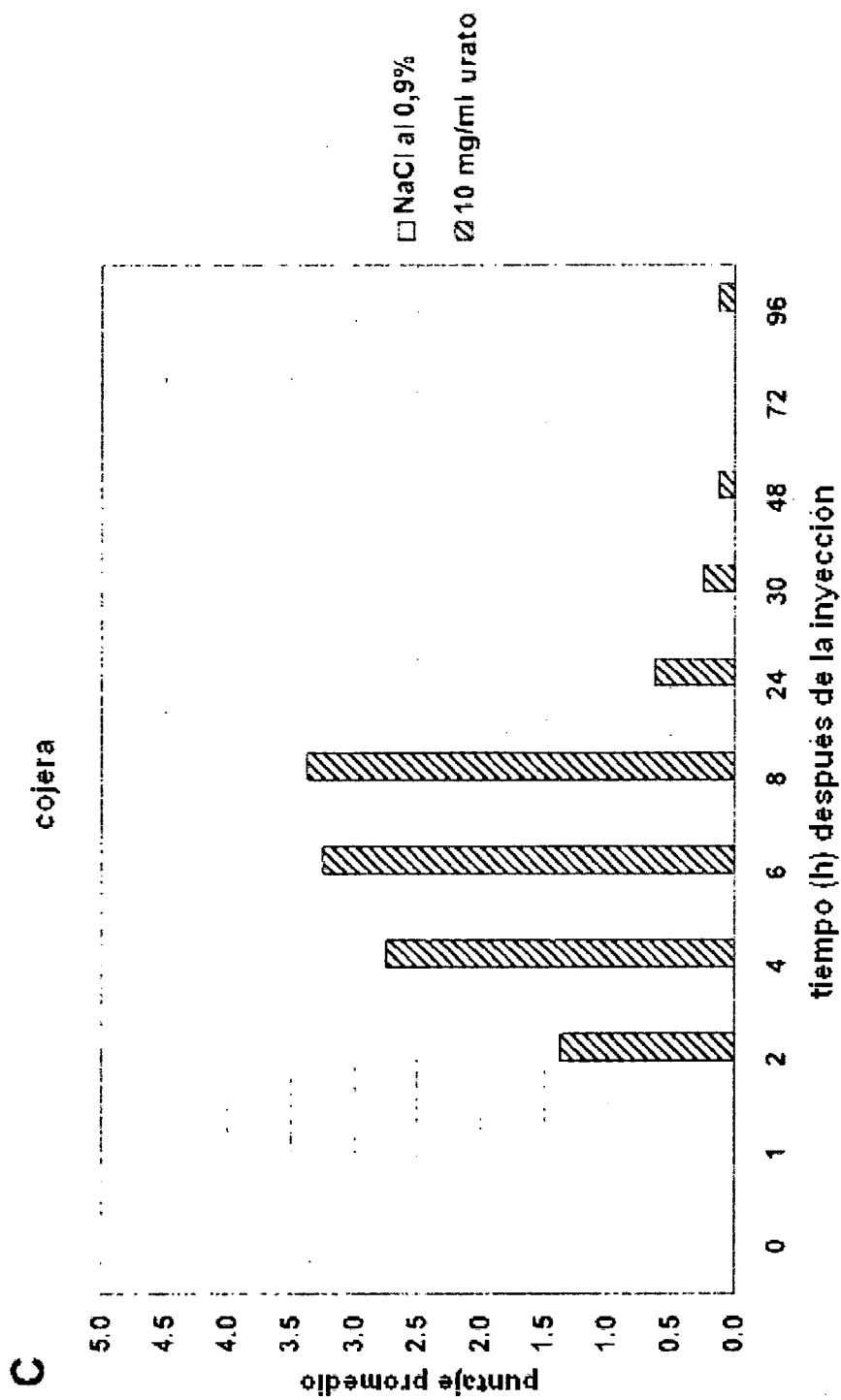


Figura 6 (continuación)

1SS

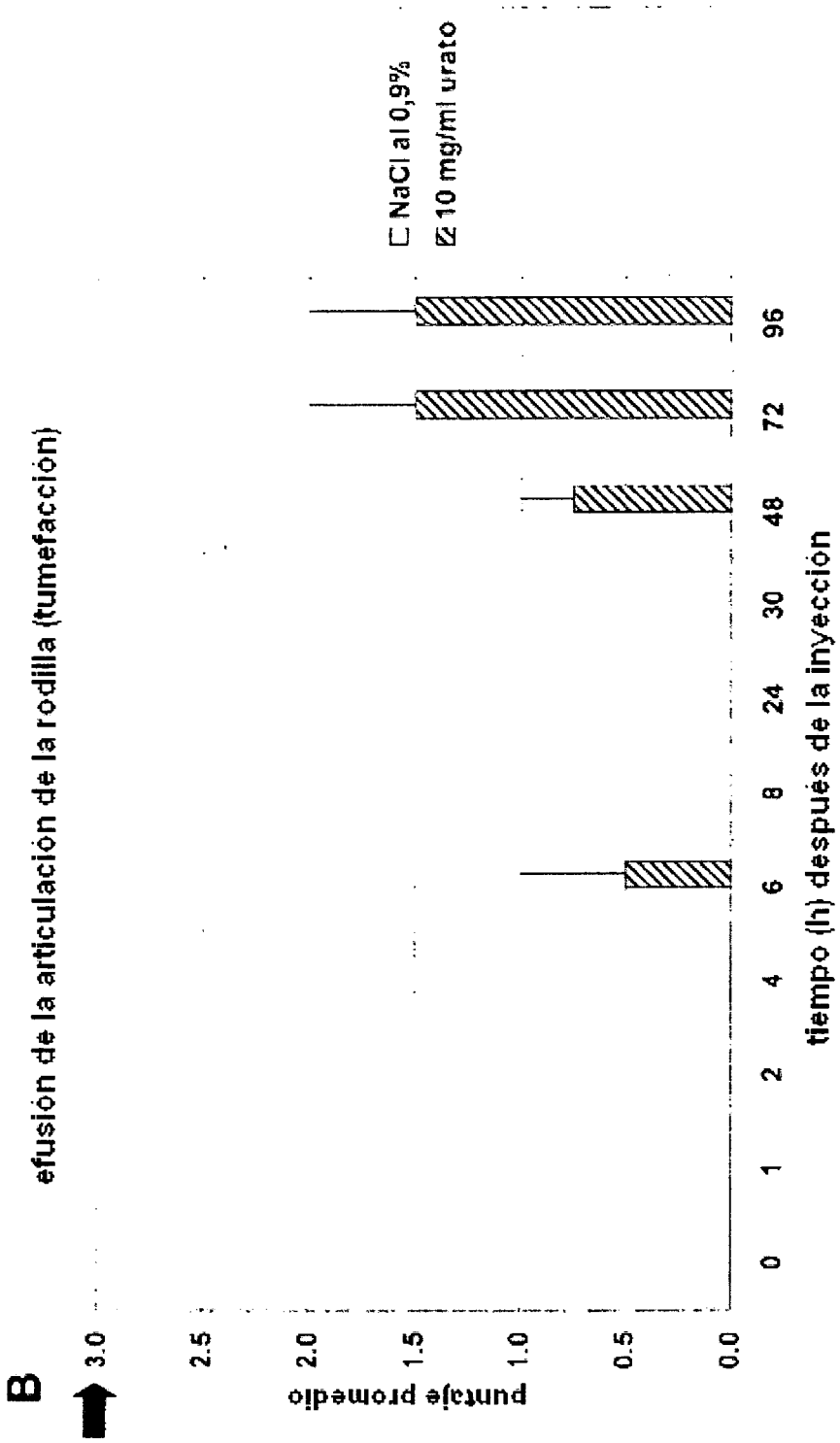


Figura 7 (continuación)

188

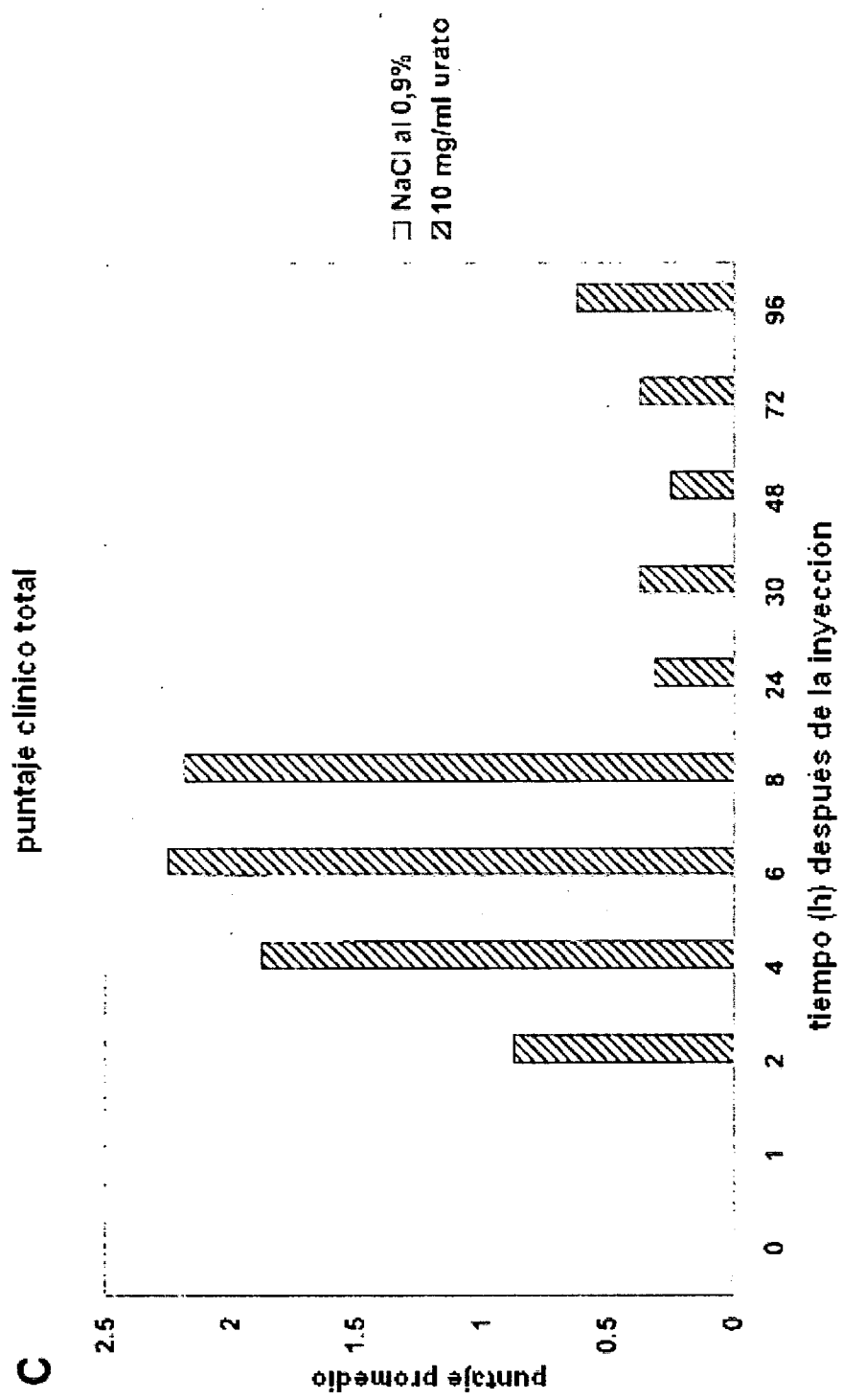


Figura 7 (continuación)

1st.

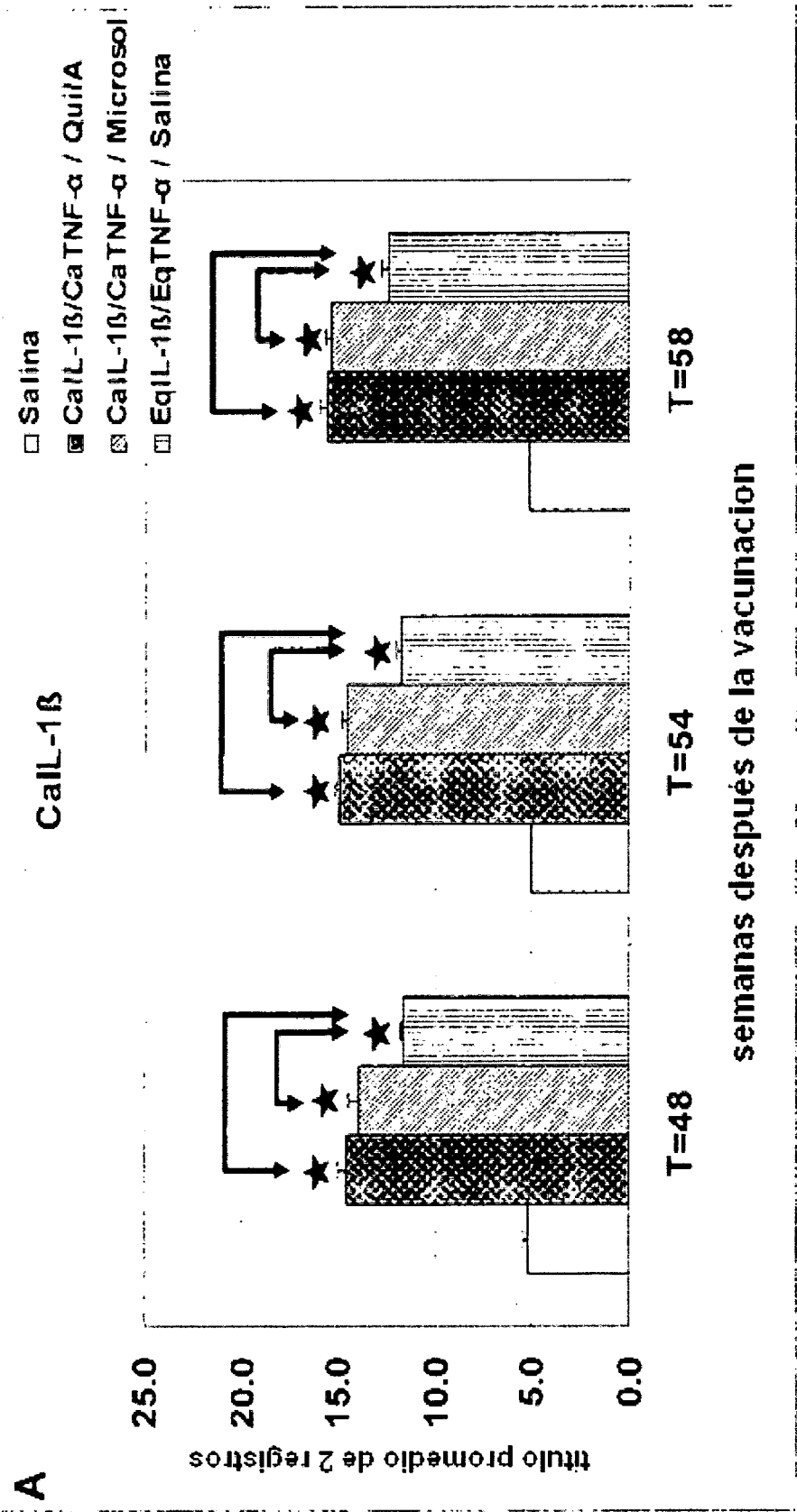


Figura 8

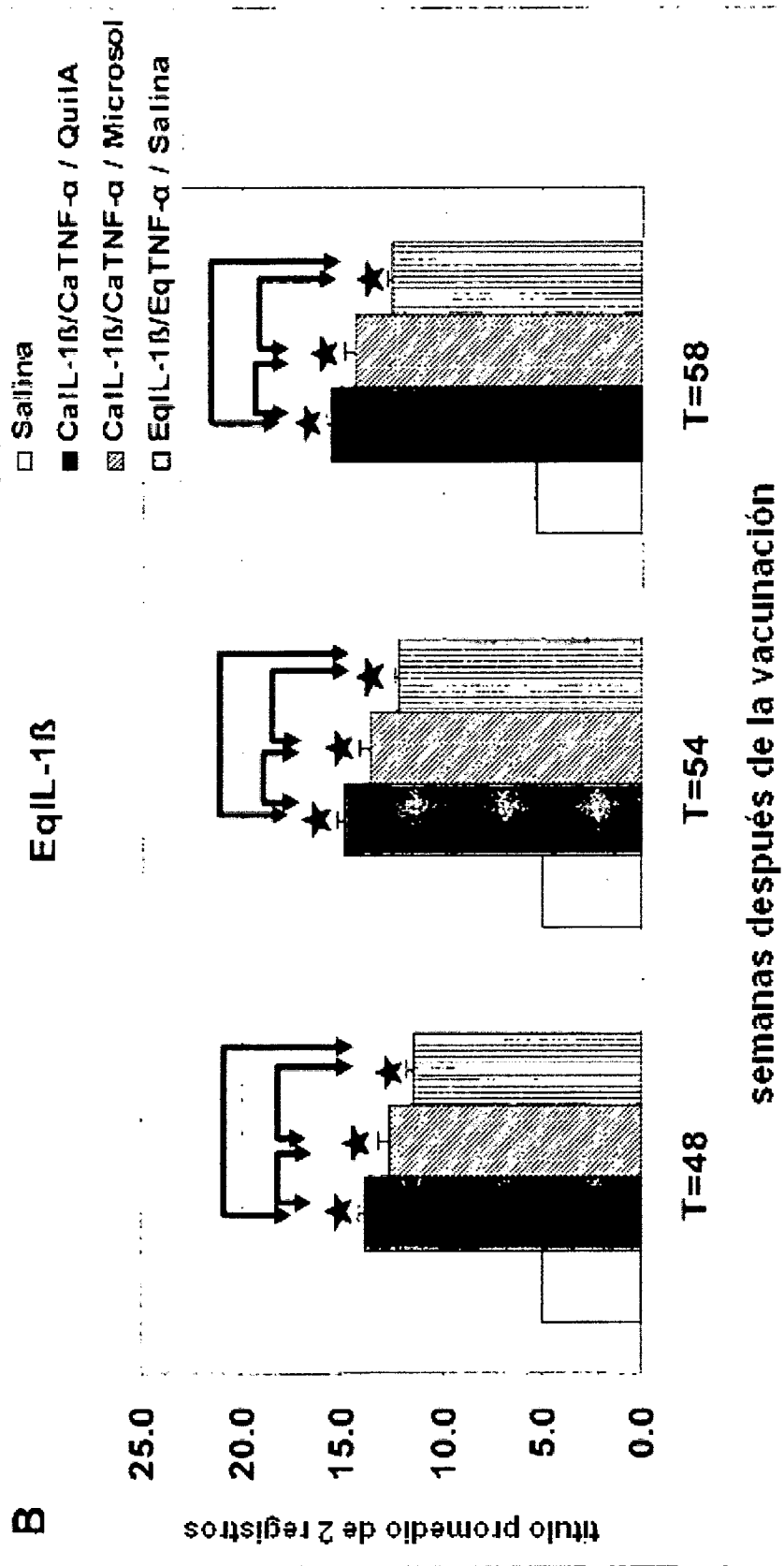


Figura 8 (continuación)

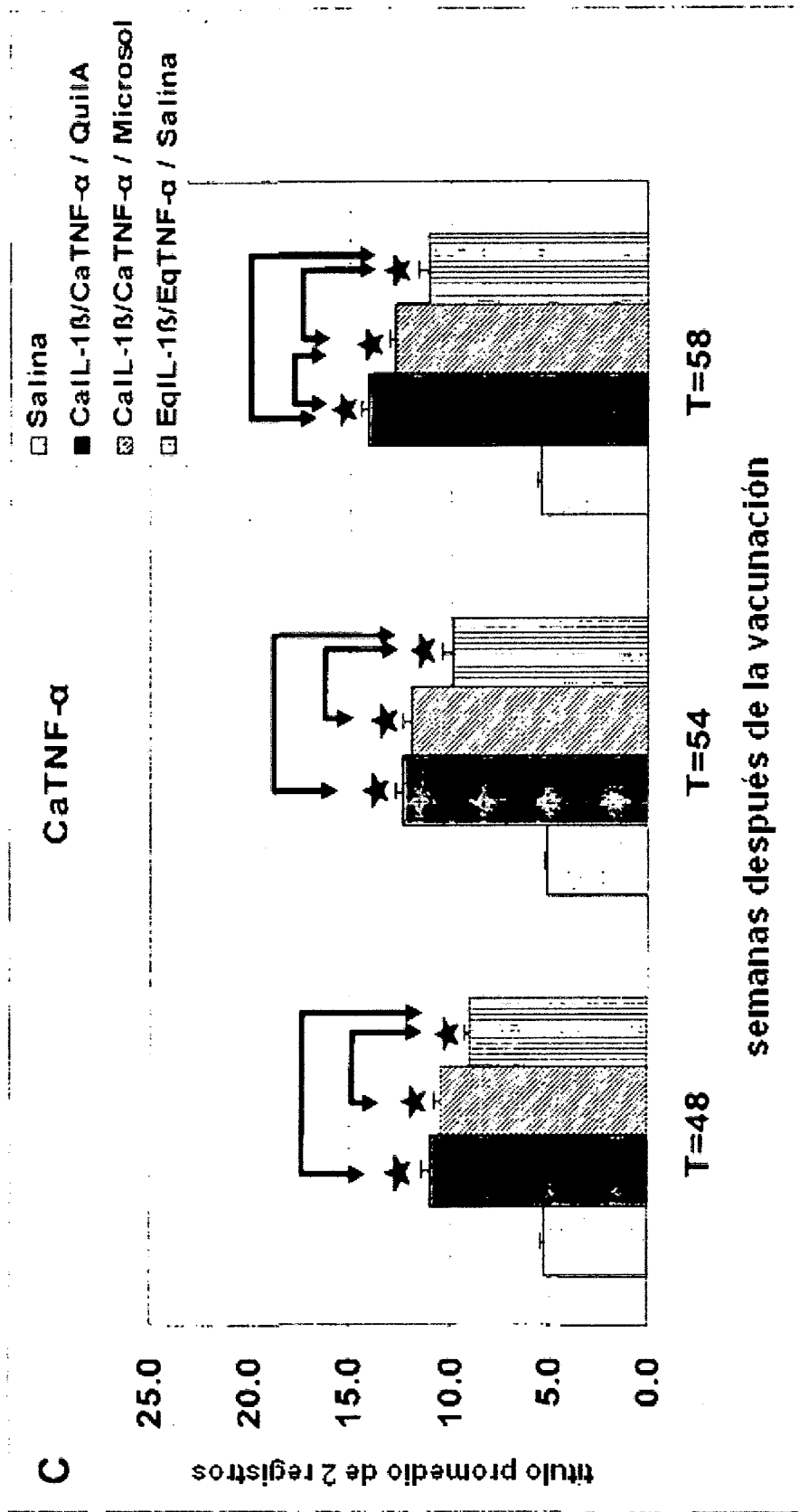


Figura 8 (continuación)

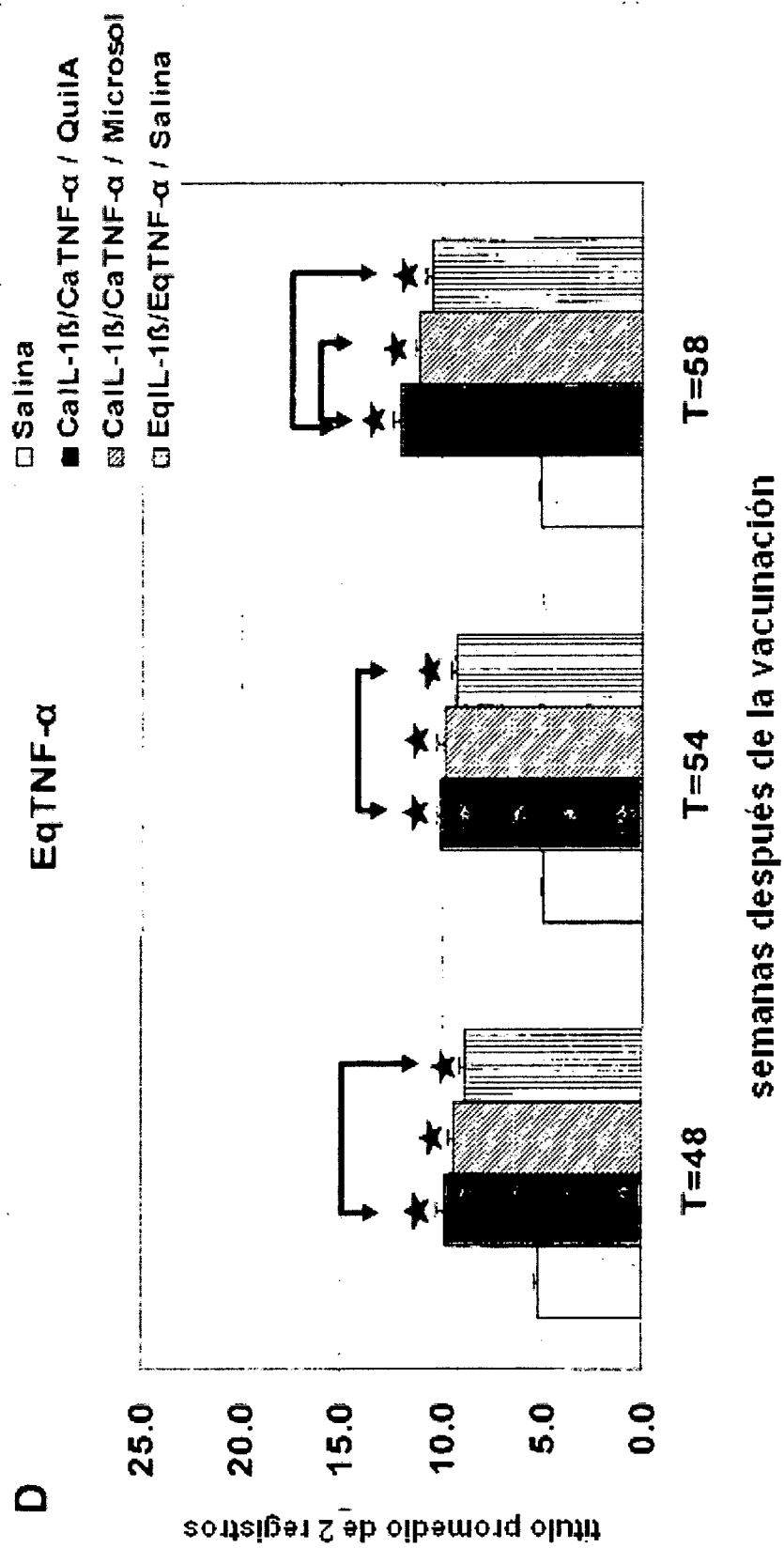


Figura 8 (continuación)

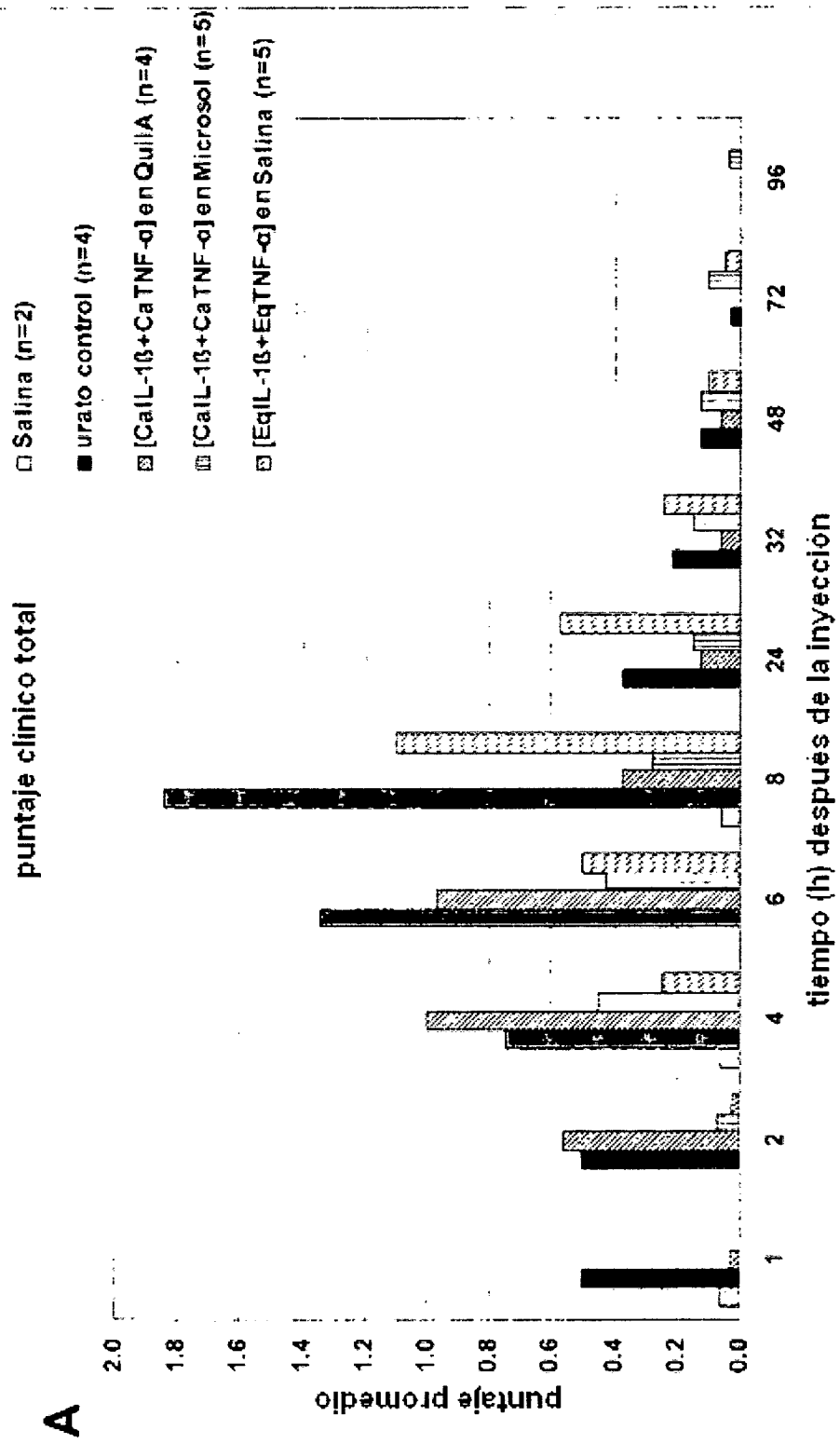


Figura 9

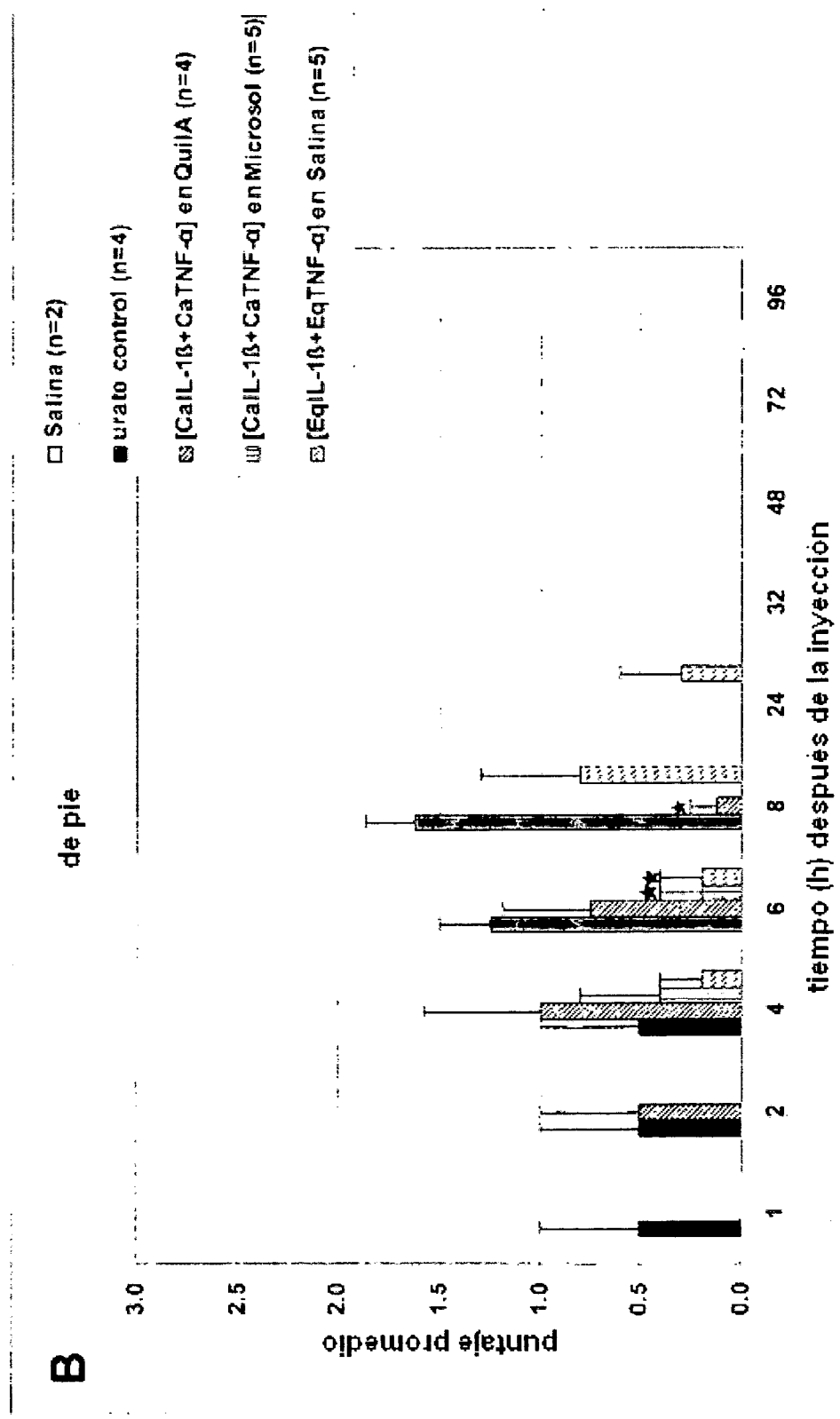


Figura 9 (continuación)

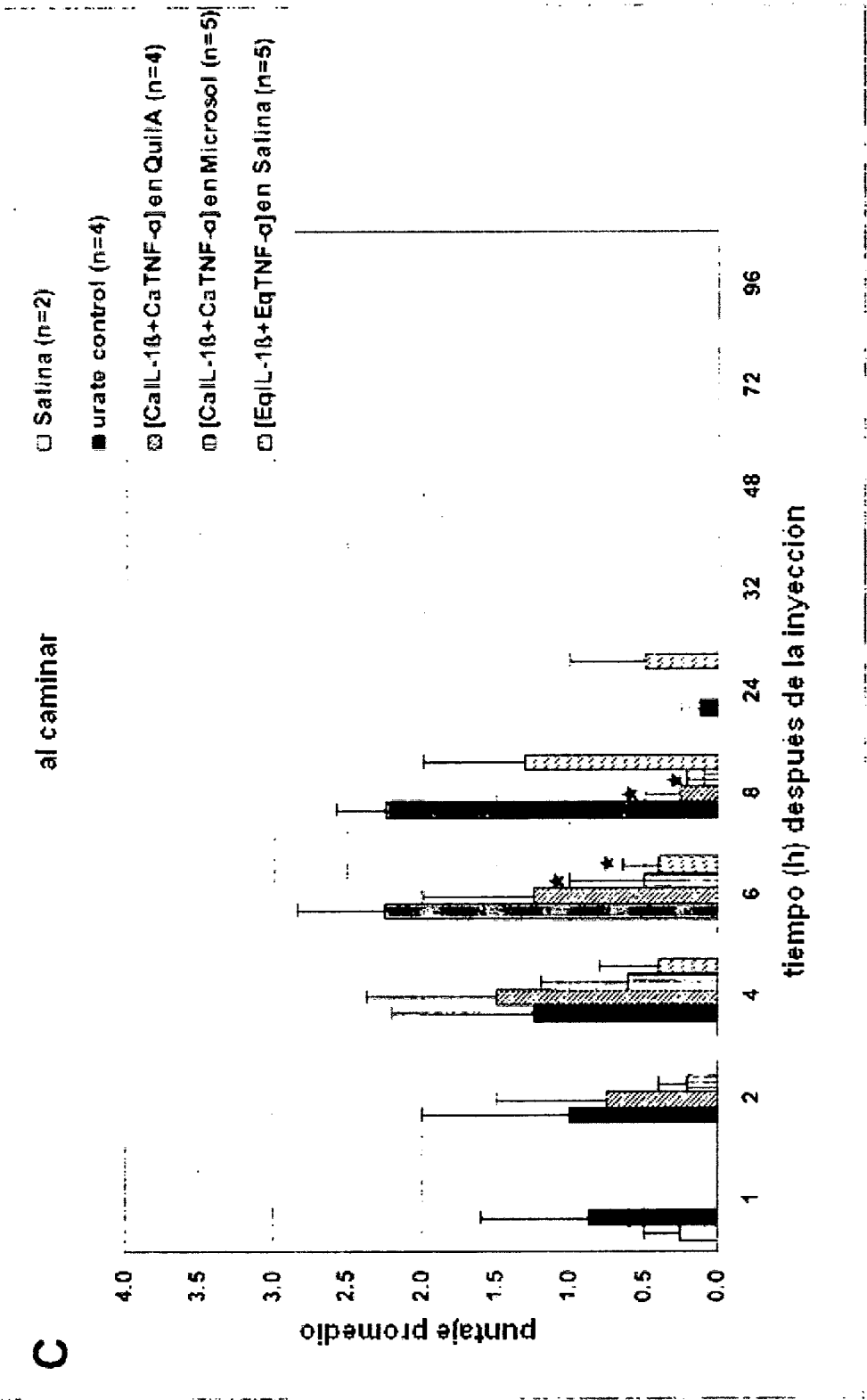


Figura 9 (continuación)

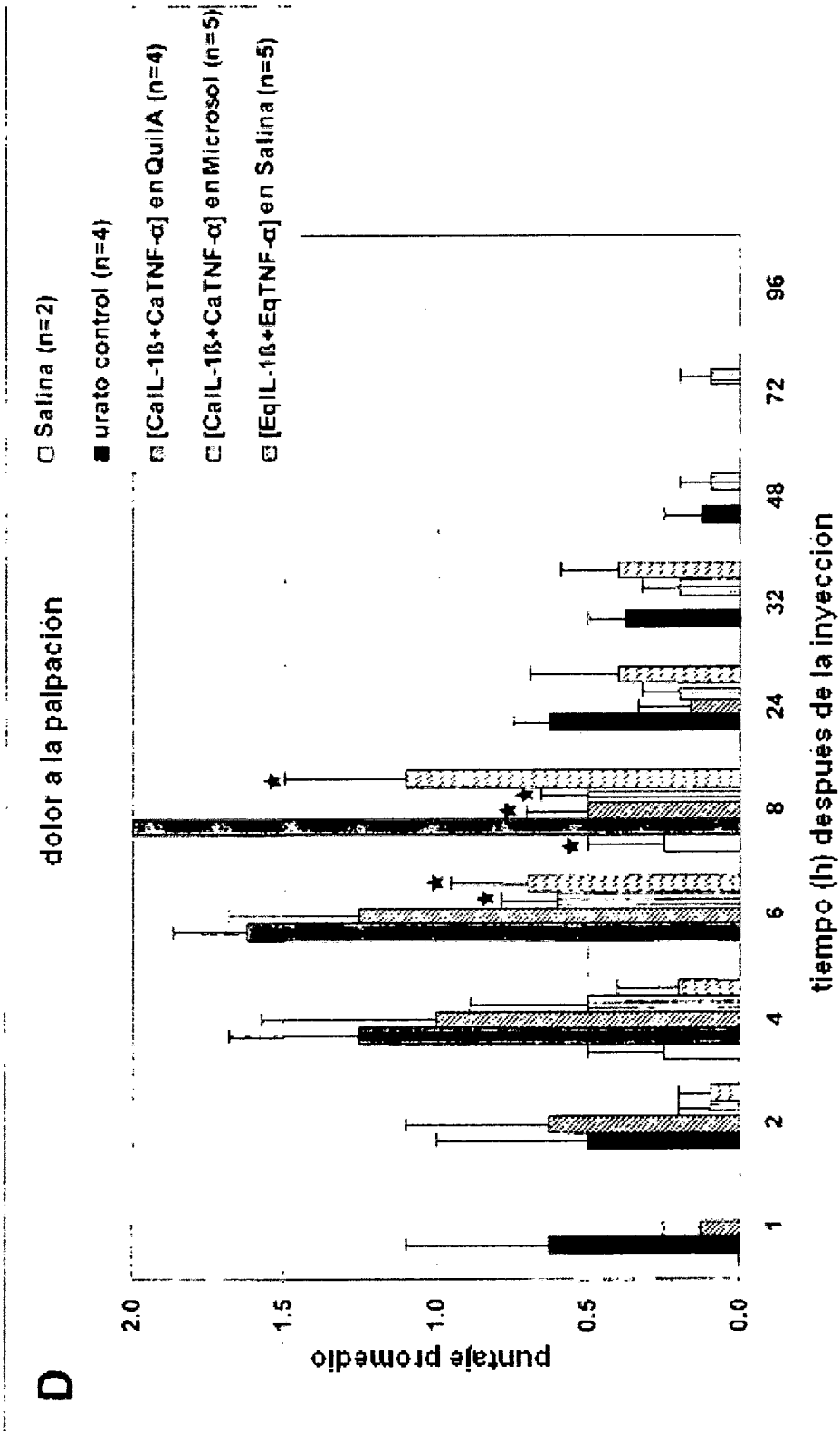


Figura 9 (continuación)

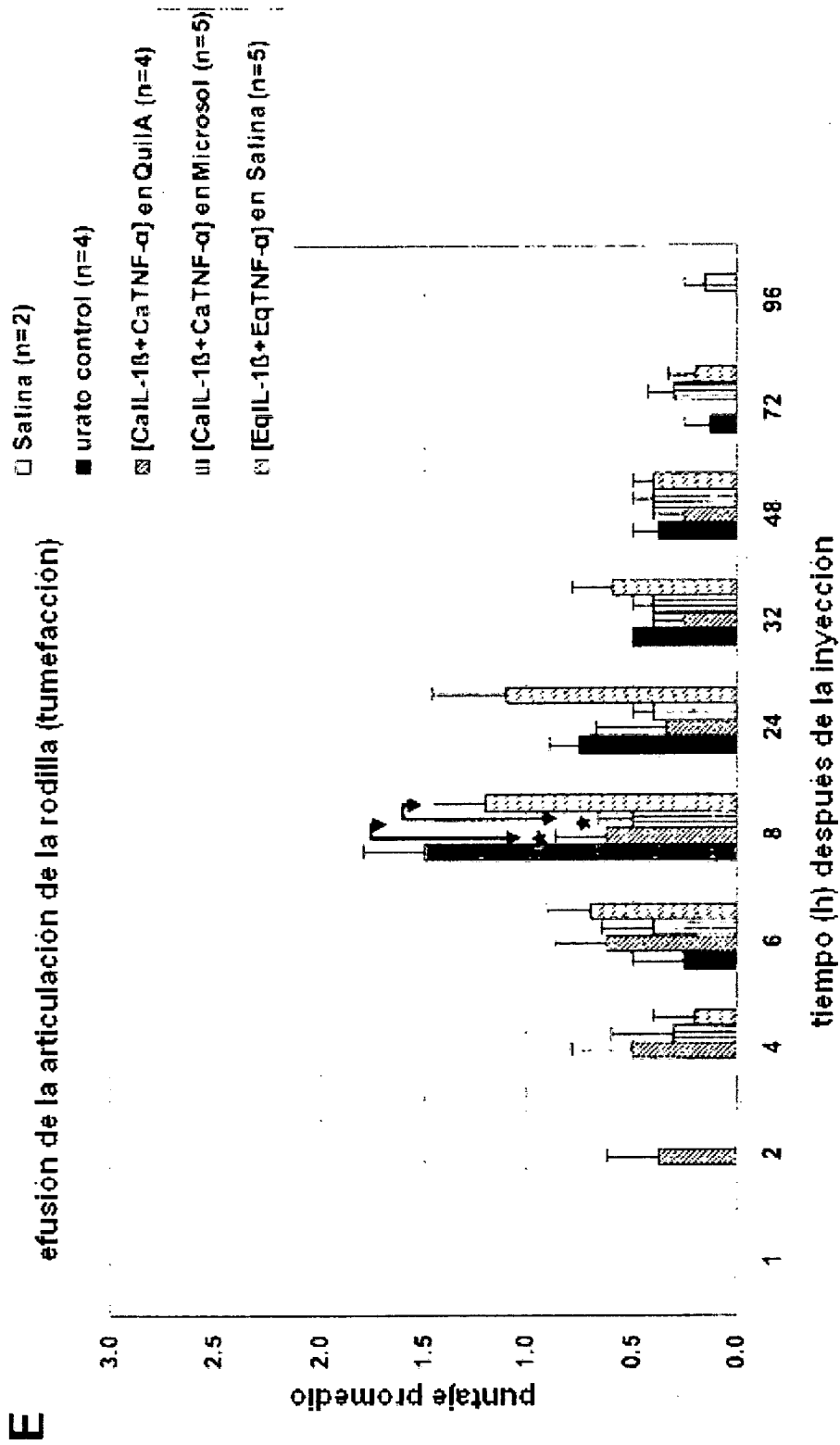


Figura 9 (continuación)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Intervet International BV
 <120> vacuna para la Osteo artritis
 <130> 2007.018
 <160> 8
 <170> Patente en versión 3.5
 <210> 1
 <211> 585
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <223> gen de fusión
 <221> CDS
 <222> (1)..(582)
 <400> 1

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	
cgc ggc agc cat atg ata tcg aat tca gca gcc atg caa tcg gtg gac	96
Arg Gly Ser His Met Ile Ser Asn Ser Ala Ala Met Gln Ser Val Asp	
20 25 30	
tgc aag tta cag gac ata agc cac aaa tac ctg gtg ctg tct aac tca	144
Cys Lys Leu Gln Asp Ile Ser His Lys Tyr Leu Val Leu Ser Asn Ser	
35 40 45	
tat gag ctt cgg gct ctc cac ctc aat ggg gaa aat gtg aac aaa caa	192
Tyr Glu Leu Arg Ala Leu His Leu Asn Gly Glu Asn Val Asn Lys Gln	
50 55 60	
gtg gtg ttc cac atg agc ttt gtg cac ggg gat gaa agt aat aac aag	240
Val Val Phe His Met Ser Phe Val His Gly Asp Glu Ser Asn Asn Lys	
65 70 75 80	
ata cct gtg gtc ttg ggc atc aaa caa aag aat ctg tac ctg tcc tgt	288
Ile Pro Val Val Leu Gly Ile Lys Gln Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys	
85 90 95	
gtg atg aag gat gga aag ccc acc cta cag cta gag aag gta gac ccc	336
Val Met Lys Asp Gly Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Lys Val Asp Pro	
100 105 110	
aaa gtc tac cca aag agg aag atg gaa aag cga ttt gtc ttc aac aag	384
Lys Val Tyr Pro Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys	
115 120 125	
ata gaa atc aag aac aca gtg gaa ttt gag tct tct cag tac cct aac	432
Ile Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu Phe Glu Ser Ser Gln Tyr Pro Asn	
130 135 140	
tgg tac atc agc acc tct caa gtc gaa gga atg cct gtc ttc cta gga	480
Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Val Glu Gly Met Pro Val Phe Leu Gly	
145 150 155 160	
aat acc aga ggt ggc cag gat ata act gac ttc acc atg gaa ttt tct	528
Asn Thr Arg Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Glu Phe Ser	
165 170 175	
tcc aca gct gca caa atc act gca gga ata gct tta cat caa tcc aac	576
Ser Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn	
180 185 190	
ctc aat tag	585
Leu Asn	

<210> 2
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructor Sintético
 <400> 2

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ile Ser Asn Ser Ala Ala Met Gln Ser Val Asp
 20 25 30

Cys Lys Leu Gln Asp Ile Ser His Lys Tyr Leu Val Leu Ser Asn Ser
 35 40 45

Tyr Glu Leu Arg Ala Leu His Leu Asn Gly Glu Asn Val Asn Lys Gln
 50 55 60

Val Val Phe His Met Ser Phe Val His Gly Asp Glu Ser Asn Asn Lys
 65 70 75 80

Ile Pro Val Val Leu Gly Ile Lys Gln Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys
 85 90 95

Val Met Lys Asp Gly Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Lys Val Asp Pro
 100 105 110

Lys Val Tyr Pro Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys
 115 120 125

Ile Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu Phe Glu Ser Ser Gln Tyr Pro Asn
 130 135 140

Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Val Glu Gly Met Pro Val Phe Leu Gly
 145 150 155 160

Asn Thr Arg Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Glu Phe Ser
 165 170 175

Ser Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn
 180 185 190

Leu Asn

<210> 3

<211> 588

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> gen de fusión

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(585)

<400> 3

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	

cgc ggc agc cat atg gtc aaa tca tct tct cga acc cca agt gac aag	96
Arg Gly Ser His Met Val Lys Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys	
20 25 30	

cca gta gct cat gtt gta gca aac ccc gaa gct gag ggg cag ctc cag	144
Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Glu Ala Glu Gly Gln Leu Gln	
35 40 45	

tgg ctg agc cga cgt gcc aat gcc ctc ctg gcc aac ggc gtg gag ctg	192
Trp Leu Ser Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu	
50 55 60	

aca gac aac cag ctg ata gtg ccg tca gat ggg ttg tac ctc atc tac	240
Thr Asp Asn Gln Leu Ile Val Pro Ser Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr	
65 70 75 80	

tcc cag gtc ctc ttc aag ggc caa ggg tgc cct tcc acc cat gtg ctc	288
Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu	
85 90 95	

ctc acc cac acc atc agc cgc ttc gcc gtc tcc tac cag aca aag gtc	336
Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Phe Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val	
100 105 110	

aac cta ctc tct gcc atc aag agc cct tgc caa agg gag acc cca gag	384
Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu	
115 120 125	

ggg acc gag gcc aag ccc tgg tac gag ccc atc tac ctg gga ggg gtc	432
Gly Thr Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val	
130 135 140	

ttc caa ctg gag aag ggt gat cga ctc agc gct gag atc aat ctg cct	480
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Leu Pro	
145 150 155 160	

aac tat ctg gac ttt gcc gag tcc ggg cag gtg tac ttt ggg atc att	528
Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile	
165 170 175	

gcc ctg aca gct gca caa atc act gca gga ata gct tta cat caa tcc	576
Ala Leu Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser	
180 185 190	

aac ctc aat tag	588
Asn Leu Asn	
195	

<210> 4

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructor Sintético

<400> 4

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Val Lys Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys
20 25 30

Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Glu Ala Glu Gly Gln Leu Gln
35 40 45

Trp Leu Ser Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu
50 55 60

Thr Asp Asn Gln Leu Ile Val Pro Ser Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
85 90 95

Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Phe Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val
100 105 110

Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu
115 120 125

Gly Thr Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Leu Pro
145 150 155 160

Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile
165 170 175

Ala Leu Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser
180 185 190

Asn Leu Asn
195

<210> 5

<211> 525

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> gen de fusión

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(522)

<400> 5

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	

cgc ggc agc cat atg gca gct gtg cat tca gtg aac tgc aga ctc cgg	96
Arg Gly Ser His Met Ala Ala Val His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg	
20 25 30	

gac ata tac cat aaa tcc ctg gtg ctg tcc ggt gca tgt gag ctg cag	144
Asp Ile Tyr His Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln	
35 40 45	

gct gtc cac ctc aat gga gag aat aca aac caa caa gtg gtg ttc tgc	192
Ala Val His Leu Asn Gly Glu Asn Thr Asn Gln Gln Val Val Phe Cys	
50 55 60	

atg agc ttt gtg caa gga gaa gaa gag act gac aag ata cct gtg gcc	240
Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr Asp Lys Ile Pro Val Ala	
65 70 75 80	

ttg ggc ctc aag gga aag aat ctg tac ctg tct tgt ggg acg aaa gat	288
Leu Gly Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Gly Thr Lys Asp	
85 90 95	

ggg aag ccc atc ctg cag ctg gag aca gta gac ccc aat act tac cca	336
Gly Lys Pro Ile Leu Gln Leu Glu Thr Val Asp Pro Asn Thr Tyr Pro	
100 105 110	

aag agg aaa atg gaa aag cga ttt gtc ttc aac aag atg gaa atc aag	384
Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met Glu Ile Lys	
115 120 125	

ggc aac gtg gaa ttt gag tct gca atg tac ccc aac tgg tac atc agc	432
Gly Asn Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser	
130 135 140	

acc tct caa gca gaa aaa aag cct gtc ttc cta gga aat acc aga ggc	480
Thr Ser Gln Ala Glu Lys Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly	
145 150 155 160	

ggc cgg gac ata act gac ttc atc atg gaa atc acc tct gcc taa	525
Gly Arg Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala	
165 170	

171

<210> 6

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructor Sintético

<400> 6

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ala Val His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg
 20 25 30

Asp Ile Tyr His Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln
 35 40 45

Ala Val His Leu Asn Gly Glu Asn Thr Asn Gln Gln Val Val Phe Cys
 50 55 60

Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr Asp Lys Ile Pro Val Ala
 65 70 75 80

Leu Gly Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Gly Thr Lys Asp
 85 90 95

Gly Lys Pro Ile Leu Gln Leu Glu Thr Val Asp Pro Asn Thr Tyr Pro
 100 105 110

Lys Arg Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met Glu Ile Lys
 115 120 125

Gly Asn Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser
 130 135 140

Thr Ser Gln Ala Glu Lys Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly
 145 150 155 160

Gly Arg Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala
 165 170

<210> 7

<211> 537

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> gen de fusión

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(534)

<400> 7

atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg	48
Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro	
1 5 10 15	

cgc ggc agc cat atg ctc aga tca tct tct cga acc cca agt gac aag	96
Arg Gly Ser His Met Leu Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys	
20 25 30	

cct gta gcc cat gtt gta gca aac ccc caa gcc gag ggg cag ctc cag	144
Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln	
35 40 45	

tgg ctg agt ggg cgt gca aat gcc ctc ctg gcc aat ggc gtg aag ctg	192
Trp Leu Ser Gly Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Lys Leu	
50 55 60	

aca gac aac cag ctg gtg gta cca ttg gat ggg ctg tac ctc atc tac	240
Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Leu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr	
65 70 75 80	

tcc cag gtc ctc ttc aaa ggc caa ggc tgc cct tcc acc cat gtg ctc	288
Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu	
85 90 95	

ctc acc cac acc atc agc cgc tta gct gtc tcc tac ccg tcc aag gtc	336
Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Leu Ala Val Ser Tyr Pro Ser Lys Val	
100 105 110	

aac ctc ctc tct gcc atc aag agc cct tgc cac acg gag tcc cca gag	384
Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys His Thr Glu Ser Pro Glu	
115 120 125	

cag gct gaa gcc aag ccc tgg tat gag ccc atc tac ctg gga gga gtc	432
Gln Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val	
130 135 140	

ttc cag ctg gag aag ggt gat caa ctc agc gct gag atc aat cag ccc	480
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ile Asn Gln Pro	
145 150 155 160	

aac tat ctc gac ttt gcg gag tcc ggg cag gtc tac ttt ggg atc att	528
Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile	
165 170 175	

gcc ctg tga	537
Ala Leu	

<210> 8

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructor Sintético

<400> 8

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Leu Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys
20 25 30

Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln
35 40 45

Trp Leu Ser Gly Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Lys Leu
50 55 60

Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Leu Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
85 90 95

Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Leu Ala Val Ser Tyr Pro Ser Lys Val
100 105 110

Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys His Thr Glu Ser Pro Glu
115 120 125

Gln Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ile Asn Gln Pro
145 150 155 160

Asn Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile
165 170 175

Ala Leu

174

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/062722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/039552 A (CYTOS BIOTECHNOLOGY AG [CH]; BACHMANN MARTIN [CH]; SPOHN GUNTHER [CH]) 12 April 2007 (2007-04-12) cited in the application paragraph [0006] - paragraph [0013] claims 32,36	1-11
A	WO 98/46642 A (FERRING FARMA LAB [DK]; JENSEN MARTIN ROLAND [DK]; MOURITSEN SOEREN [D]) 22 October 1998 (1998-10-22) abstract; claim 39	1-11
A	WO 2006/131013 A (ESBATECH AG [CH]; EWERT STEFAN [CH]; BARBERIS ALCIDE [CH]; URECH DAVID) 14 December 2006 (2006-12-14) page 37, last paragraph - page 38, paragraph 1; claim 28	1-11
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 January 2009

Date of mailing of the international search report

22/01/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vicente, Teresa

175

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/062722

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOLDRING STEVEN R ET AL: "The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis" CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH, PHILADELPHIA; PA; US, no. 427 Suppl, 1 October 2004 (2004-10-01), pages S27-S36, XP008099457 ISSN: 0009-921X page S29, right-hand column	1-11

176.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/062722

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007039552 A	12-04-2007	AU 2006298767 A1 CA 2623287 A1 CN 101267834 A EP 1931383 A1 KR 20080047564 A	12-04-2007 12-04-2007 17-09-2008 18-06-2008 29-05-2008
WO 9846642 A	22-10-1998	AT 326481 T AU 743400 B2 AU 7030398 A BR 9811462 A CA 2289476 A1 CN 1252809 A CZ 9903657 A3 DE 69834556 T2 EE 9900461 A EP 0975668 A1 ES 2264569 T3 HK 1022918 A1 JP 2001521386 T NO 995002 A NZ 337955 A PL 336295 A1 RU 2241715 C2 SK 140999 A3 TR 9902562 T2	15-06-2006 24-01-2002 11-11-1998 12-09-2000 22-10-1998 10-05-2000 12-09-2001 10-05-2007 15-06-2000 02-02-2000 01-01-2007 11-08-2006 06-11-2001 15-12-1999 29-09-2000 19-06-2000 10-12-2004 12-06-2000 21-02-2000
WO 2006131013 A	14-12-2006	AU 2006255415 A1 CA 2609999 A1 EP 1891110 A2 KR 20080031003 A	14-12-2006 14-12-2006 27-02-2008 07-04-2008

177

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 039/000	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) INTERVET INTERNATIONAL B.V.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	07117111.0	25/09/2007	EP
	60/974,903	25/09/2007	US
	61/014,877	19/12/2007	US
	07150183.7	20/12/2007	EP
		(72) Inventor(es) WILHELMUS GERARDUS JOHANNES DEGEN VIRGIL ELISABETH JOSEPH CASPAR SCHIJNS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25/04/2010		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 02/04/2009	
Fecha de presentación de la solicitud: 24/09/2008		N° publicación: WO 2009/040361 A1	
No. de solicitud PCT/EP2008/062722			
(54) Titulo: VACUNA PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS			

Reivindicación(es):

1. La vacuna para el tratamiento de la osteoartritis en vertebrados que comprende las citoquinas IL-1 β y opcionalmente de TNF- α o los derivados de las mismas, y en asociación con la dicha IL-1 β y la opcional TNF- α o los derivados de las mismas, una parte que no es propia con respecto a los vertebrados tal que la vacuna suscita una respuesta inmune en el vertebrado contra las moléculas propias IL-1 β y opcionalmente TNF- α de dicho vertebrado.
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las citoquinas IL-1 β y de TNF- α o los derivados de las mismas son homólogos con respecto al vertebrado que se trata.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde la parte que es no propia con respecto al vertebrado comprende un determinante antigénico derivado de un microorganismo.
4. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la parte que es no propia con respecto al vertebrado comprende un adyuvante.
5. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas tienen una bioactividad que es reducida cuando se las compara con las citoquinas IL-1 β y TNF- α propias del vertebrado.
6. El uso de las citoquinas IL-1 β y opcionalmente las TNF- α para producir una vacuna para el tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas son homólogos con respecto al vertebrado tratado.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas se asocian con un determinante antigénico derivado de un microorganismo para producir la vacuna.

9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 – 8, en donde las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas se asocia con un adyuvante para producir la vacuna.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado porque las citoquinas IL-1 β y TNF- α o los derivados de las mismas tienen una bioactividad que es reducida cuando se les compara con las citoquinas IL-1 β y TNF- α propias del vertebrado.
11. El tratamiento de la osteoartritis en un vertebrado por administración de una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

178

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 16,870
FECHA : MARZO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-034638- -00000-0000

Fecha: 2010-03-24 16:39:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	176773822	03/03/2010	39,745,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

\$

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 04975 - 041-003 - 6.

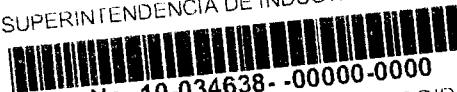
179

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 18,592
FECHA : MARZO 9 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-034638--00000-0000

Fecha: 2010-03-24 16:39:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325689700	09/03/2010	2,560,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
		TOTAL :	\$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 04975-841-003-6.

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
INTERVET INTERNACIONAL, B.V.

REFERENCIA	Radicación No.	10 034638
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/062722
	Fecha inicio fase nacional	25/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>06370</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

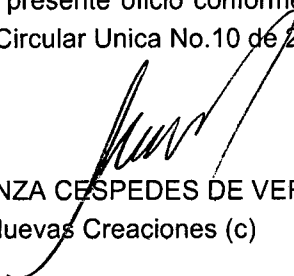
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 034638

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 MAYO 2010
adpa11