



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda.

DVN
OK

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

09-145155

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: OBTENCION DE UN PREPARADO VACUNAL
HOMOGENEO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 39/395

71. SOLICITANTE: CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

DOMICILIO: Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, 12160,
Ciudad de La Habana - CUBA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA D.C., 18 DIC. 2009

Título, C...
Fu 29-01-2010



No. 09-145155- -00000-0000

Fecha: 2009-12-18 14:24:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

Dirección: **Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, 12100, Ciudad de La Habana - CUBA**

Nacionalidad o Domicilio: **Ciudad de La Habana - CUBA**

Lugar de Constitución: **CUBA**

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**

Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**

Teléfono: **7560770** Fax: **7550158**

E-mail: **info@castellanosyco.com**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número **39'779.654** TPA **70,819**

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO No. 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/CU2008/000005**

Fecha **26/06/2008**

Publicación Internacional No. **WO 2009/003425 A1**

Fecha **08/01/2009**

⑥

Título (54)

OBTENCION DE UN PREPARADO VACUNAL HOMOGENEO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER (Falso D)

⑦

Clasificación Internacional (51) **A61K 39/385**

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

CU

29/06/2007

154-2007

⑨

Comprobante de pago No. **09-95.250 y 09-95.252**

Fecha **Diciembre 17, 2009**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ 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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: **Tarjeta Propietario y Extracto para la publicación**

11 FIGURA CARACTERISTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
FIRMA: 
C.C. No. 39779.654 Usaquéen - TPA 70.819 C.S.J.

18 DIC 2009

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **GRYSELL MARIA RODRIGUEZ MARTINEZ**
Calle 1ra. E/ 178 y 180, Edificio 84 apto. 8, Flores
C.P. 11600 Playa, Ciudad de La Habana
CUBA
2. **LISEL VIÑA RODRIGUEZ**
Calle 227 No. 21826 E/ 218 y 222, Fontanar
C.P. 19250 Boyeros, Ciudad de La Habana
CUBA
3. **LOANY CALVO GONZALEZ**
Calle 27 E/ E y D No. 557, 1er Piso, apto. 3
C.P. 10600 Plaza, Ciudad de La Habana
CUBA
4. **ARIADNA CUEVAS FIALLO**
Calle 45 No. 19401 apto. 3 E/ 194 y 196, Versalles
C.P. 11500 Lisa, Ciudad de La Habana
CUBA
5. **ERNESTO CHICO VELIZ**
Calle 1ra. E/ 178 y 180 Edificio 84 apto. 8, Flores
C.P. 11600 Playa, Ciudad de La Habana
CUBA
6. **AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA**
Calle Kholy No. 51 bajos E/ 28 y 30 Kholy
C.P. 10300 Plaza, Ciudad de La Habana
CUBA
7. **TANIA CROMBET RAMOS**
Calle B No. 8302 E/ 5a. y 100, Altahabana
C.P. 10800 Boyeros, Ciudad de La Habana
CUBA
8. **AIRAMA ALBISA NOVO**
Calle 61 No. 10210 E/ 102 y 106
C.P. 11500 Marianao, Ciudad de La Habana
CUBA
9. **GISELA MARIA GONZALEZ MARINELLO**
Calle 82B No. 516 E/ 5ª. B y 7ª., Miramar
C.P. 11300 Playa, Ciudad de La Habana
CUBA

4

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: **PODER** conferido por **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, el poder que me confirió el **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**, con domicilio en **Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, C. Habana 12100, CUBA**, debidamente legalizado ante el Ministerio de Relaciones exteriores el día 23 de Enero de 2001; bajo el número 102503, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional en Colombia, para **OBTENCION DE UN PREPARADO VACUNAL HOMOGNEO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER.**

De la Señora Jefe,

Acepto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 - Bogotá
PBX: 756 0770

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/gcb/ P1864


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 - Bogotá
PBX: 756 0770





El anterior memorial fue presentado personalmente por

Ximara Castellanos Abandano
quien se identificó con la C. de C. No. 39.773.330

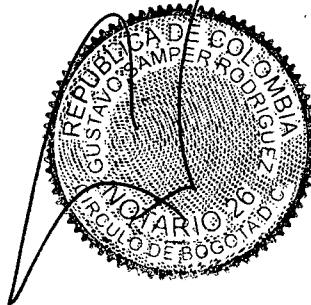
de Bogotá
Tarjeta Profesional No. 38.236 as. de 16 DIC. 2009

Bogotá, D.C.

El Notario Veintiséis

Gustavo Samper Rodríguez

[Handwritten signature]



El anterior memorial fue presentado personalmente por

Margarita Castellanos Abandano
quien se identificó con la C. de C. No. 39.779.654

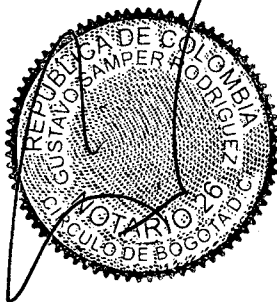
de Bogotá
Tarjeta Profesional No. 70.819.654 as. de 16 DIC. 2009

Bogotá, D.C.

El Notario Veintiséis

Gustavo Samper Rodríguez

[Handwritten signature]



PODER

El (los) suscrito (s) Agustín Lage Dávila,
Director del CENTRO DE INMINOLOGIA
MOLECULAR

domiciliado (s) en Calle 216 Esq. 15, Atabey,
Playa, C. Habana 12100, Cuba.

nombra por el presente a Ximena Castellanos A. y/o
Margarita Castellanos A. abogadas con oficinas en la Carrera 9ª
No. 93-09, Bogotá - COLOMBIA para _____

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y
con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos
representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órde-
nes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo
relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industria-
les; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas
y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñas
comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y
cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro
de licencia de uso de esos derechos; b) acciones de oposición,
cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios
civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que
se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y
gestiones arriba determinados sustituir éste mandato, transigir,
desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nom-
brar apoderados judiciales y extrajudiciales.

ado y firmado hoy 30 de Noviembre de 2000.

en Ciudad de la Habana, Cuba.

Por Agustín Lage Dávila

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned _____

of _____

hereby grant(s) Power of Attorney to Ximena Castellanos A. y/o
Margarita Castellanos A. attorneys residing at Carrera 9ª
No. 93-09 Bogotá - COLOMBIA to _____

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for wich
purpose we authorize the said attorneys to represent us before any
authorities or persons, specially those, administrative, administrative
contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of
trademarks, service, collective and defensive marks, and of
designations of origin; the deposit of commercial names and ensigns;
its renewal, extensión, recordal of assignments, change of name or
domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of
use of the above rights; b) Actions opposition, cancellation, nullity,
infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal an
administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted
by us or against us; and that in all the above matters they may
substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel,
receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys infact
in or out of Court.

Given and signed this _____

in _____

By _____

Como Notario Venetis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

16 DIC 2009

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VENETIS

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

Lic. Estrella Díaz Bosmenier
Notario



Yo, **LICENCIADA ESTRELLA DIAZ BOSMENIER**. Notaria de la Notaria Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, con sede en **GALE Y ASOCIADOS S.A.**, DOY FE que la firma que antecede es la del señor **AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA**, ciudadano cubano, con identidad permanente número 49032207966, y es auténtica por ser la que acostumbra a usar en todos sus actos.-----

Y para que así conste se expide en la Ciudad de la Habana, a los días 13 del mes diciembre del 2000.-----



[Handwritten signature]

Lic. Estrella Díaz Bosmenier
Notario



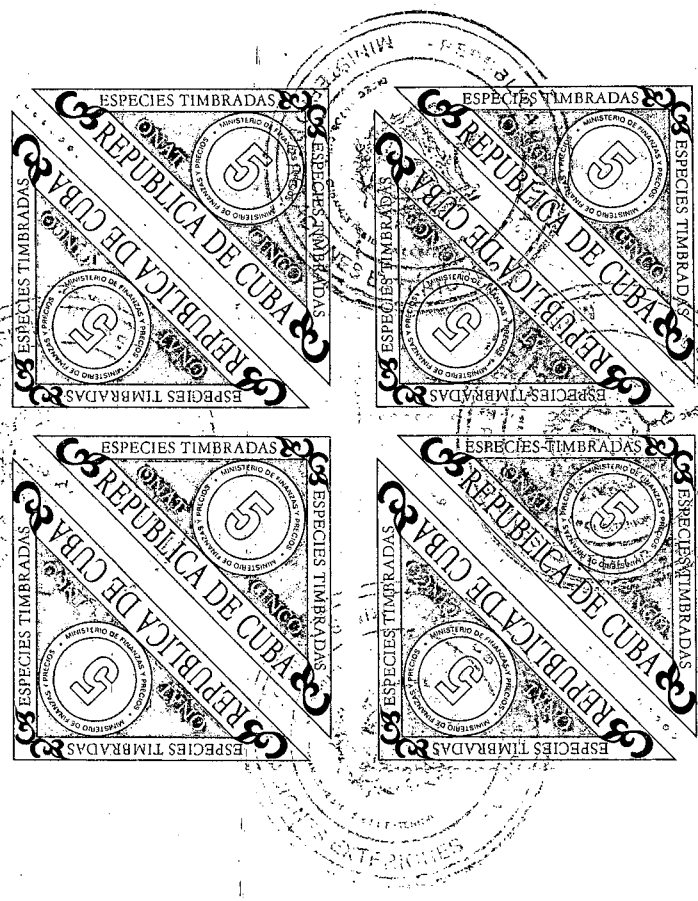
Como Notario Veintiseis del Círculo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. Colombia.

16 DIC 2009

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

EN FOLIO DE COPIA



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION DE ASUNTOS CONSULARES Y DE
CUBANOS RESIDENTES EN EL EXTERIOR.
Joaquín R. Cabañas Rodríguez, /o Manuel Capas
Ruiz, /o Mercedes de Armas García, /o Jesús
Fernández Ponce, /o María Silvia Fernández
Villar, /o Eduardo Valido García.
Funcionarios autorizados para certificar Auten-
tificaciones de firma en Documentos expedidos
para surtir efectos en el extranjero.

CERTIFICO: QUE AL FIRMAR ES AUTENTICA DEL
FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO,
LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR LA SEMEJANZA QUE
GUARDA CON LA QUE OTRA REGISTRADA EN ESTE
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A
USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.
EN FE DE LO CUAL FIRMARON LA PRESENTE CON LA
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

MADEIRA 18 DIC. 2000

Como Notario Veintiseis del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

16 DIC 2009

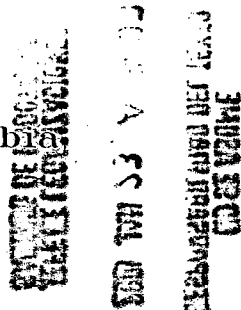
GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS



Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA



No. 1/01

La Habana, Enero 3 del 2001

La suscrita Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA**:

Que la Señora María Silvia Fernández Villar, quien como funcionaria de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que el CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR es una institución constituida según las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; que Agustín Lage Dávila, quien en su carácter de Director de la citada institución confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



Vilma Rebeca Gálvez López

Vilma Rebeca Gálvez López
Auxiliar Administrativo 5 PA
Encargada de Funciones Consulares

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. - Colombia.

16 DIC 2009

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL

US\$ 7.00 (siete dólares)

DERECHOS FONDO ROTATORIO

US\$ 100.00 (cien dólares)

TOTAL PAGADO

US\$ 107.00 (cientosiete dólares)

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JAN 31 07

JEFE DE REALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

Con el fin de garantizar la integridad del documento

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

102503

U. S. G. S.
CUIA TAMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

Como Notario Veintiseis del Circulo de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

16 DIC 2009

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de Enero de 2009 (08.01.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/003425 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/385 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2008/000005

(22) Fecha de presentación internacional:
26 de Junio de 2008 (26.06.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
CU 154-2007 29 de Junio de 2007 (29.06.2007) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
[CU/CU]; Calle 216 Esq. A 15, Atabey, Playa, Habana
11600, Cuba, Ciudad De La Habana 11600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): RO-
DRÍGUEZ MARTÍNEZ, Gryssell María [CU/CU];
Calle 1ra. E/ 178 y 180. Edificio 84 apto. 8, Flores,
C.P. 11600. Playa, Cuba, Ciudad De La Habana 11600
(CU). VIÑA RODRÍGUEZ, Lisel [CU/CU]; Calle 227
No. 21826 E/ 218 y 222. Fontanar, C.P. 19250. Boyeros,
Cuba, Ciudad De La Habana 19250 (CU). CALVO

GONZÁLEZ, Loany [CU/CU]; Calle 27 E/ E y D No.
557. 1er. Piso apto. 3, C.P. 10600. Plaza, Cuba, Ciudad
De La Habana 10600 (CU). CUEVAS FIALLO, Arladna
[CU/CU]; Calle 45 No. 19401 apto. 3 E/ 194 y 196.
Versalles C.P. 11500. Lisa, Cuba, Ciudad De La Habana
11500 (CU). CHICO VELIZ, Ernesto [CU/CU]; Calle
1ra. E/ 178 y 180 Edificio 84 apto. 8, Flores, C.P. 11600.
Playa, Cuba, Ciudad De La Habana 11600 (CU). CROM-
BET RAMOS, Tania [CU/CU]; Calle B No. 8302 E/ 5ª
y 100. Altahabana, C.P. 10800. Boyeros, Cuba, Ciudad
De La Habana 10800 (CU). ALBISA NOVO, Airama
[CU/CU]; Calle 61 No. 10210 E/ 102 y 106., C.P. 11500.
Marianao, Cuba, Ciudad De La Habana 11500 (CU).
GONZÁLEZ MARINELLO, Gisela María [CU/CU];
Calle 82b No. 516 E/ 5ª B y 7ª., C.P. 11300. Playa, Cuba,
Ciudad De La Habana 11300 (CU). LAGE DÁVILA,
Agustín Bienvenido [CU/CU]; Calle Kholy No., 51 bajos
E/ 28 y 30 Kholy, C.P. 11300. Plaza, Cuba, Ciudad De La
Habana 11300 (CU).

(74) Mandatario: MOREJÓN LIMA, Dianelys; Ave 1ra #
1001 esq. 10, Miramar, Playa, Cuba, Ciudad De La Habana
11300 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PRODUCTION OF AN HOMOGENEOUS VACCINE PREPARATION FOR CANCER TREATMENT

(54) Título: OBTENCIÓN DE UN PREPARADO VACUNAL HOMOGÉNEO PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

(57) Abstract: The present invention concerns the biotechnology sector and more specifically human healthcare. In particular, the present invention describes a vaccine composition for therapeutic use thereof on cancer patients. The vaccine composition described in the present invention has as active principle a chemical conjugate of human recombinant Epidermic Growth Factor (hrEGF) and recombinant protein P64k. In addition, specific conditions are described for performing a conjugation reaction which produces said chemical conjugate in a controlled and reproducible manner. In another embodiment the present invention concerns a method for purification of the chemical conjugate which not only provides greater purity for the therapeutic composition, but surprisingly increases the immunogenic activity, causing significant increases in the anti-EGF antibody titres in humans. In addition the present invention provides the methodology for producing a vaccine preparation with more than one type of dose presentation (total milligrams of EGF-P64k conjugates/vial). This versatility in the presentation of the vaccine preparation enables the immunization dose per patient to be increased, but without involving an increase in immunization frequency and/or the number of immunization sites. Finally, the present invention involves a healthcare method for producing the vaccine for cancer therapy, administered by parenteral means.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con la rama de la biotecnología y mas específicamente con la salud humana. Particularmente, la presente invención describe una composición vacunal para su uso terapéutico en pacientes de cáncer. La composición vacunal descrita en la presente invención tiene como principio activo un conjugado químico entre el Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (hrEGF) y la proteína recombinante P64k. Además, se describen condiciones específicas para la realización de una reacción de conjugación que permiten obtener de manera controlada y reproducible dicho conjugado químico. En otro aspecto la presente invención se relaciona con un procedimiento para la purificación del conjugado químico que no solo le aporte mayor pureza a la composición vacunal terapéutica, sino que sorprendentemente incremento la actividad inmunogénica, provocando incrementos significativos en los títulos de anticuerpos anti EGF en humanos. Adicionalmente la presente invención proporciona la metodología para lograr un preparado vacunal con más de un tipo de presentación de dosis (miligramos totales de conjugados EGF-P64k/vial). Esta versatilidad en la presentación del preparado vacunal permite incrementar la dosis de inmunización por paciente, sin que esto conlleve a aumentar la frecuencia de inmunización y/o el número de sitios de inmunización. Por ultimo, la presente invención involucra un procedimiento sanitario para la obtención del preparado vacunal para la terapia del cáncer, administrado por vía parenteral.

WO 2009/003425 A1



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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (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).

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,

Obtención de un preparado vacunal homogéneo para el tratamiento del cáncer.**RESUMEN****Sector Técnico:**

La presente invención se relaciona con la biotecnología, y más específicamente con el campo de la salud humana. En una representación, la presente invención describe vacunas protectoras y/o terapéuticas para cáncer, y particularmente proporciona composiciones vacunales que permiten el incremento significativo de la respuesta inmunitaria contra el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Factor de Crecimiento cuya relevancia oncológica ha sido ampliamente demostrada para el crecimiento de tumores fundamentalmente de origen epitelial.

Técnica Anterior:

El sistema del receptor de EGF (R-EGF) y sus ligandos constituye un complejo molecular cuya interacción regula de forma específica el crecimiento celular y ha sido demostrado su impacto en el crecimiento descontrolado de tumores de origen epitelial.

En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrinós y autocrinós de activación del (R-EGF), esta dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

El EGF, es un polipéptido de 53 aminoácidos, con un peso molecular aparente de 6045 Da. Este polipéptido fue aislado y purificado por primera vez por Cohen S., J. Biol. Chem. (1962) 237, 1. 555).

El EGF forma parte de la familia de ligandos del R-EGF, esta familia está constituida por proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Los otros miembros de esta familia son: TGF, anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epiregulina. Por otra parte la familia de los poxvirus incluye proteínas relacionadas con el EGF, dentro de ellas la más caracterizada es el factor de crecimiento de vaccinia virus (VGF).

Todas estas moléculas son capaces de unirse y activar al (R-EGF), así que son conocidas como ligandos del mismo y juegan un rol en el crecimiento de células normales y neoplásicas en menor o mayor grado.

El R-EGF es una glicoproteína de 170 kDa aproximadamente, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular de este receptor esta asociado con la actividad de proteínas tirosinas quinasas que muestran homología estructural con el producto del oncogen v-erb-B, lo que muestra una relación con el proceso de transformación maligna (Heldin C.H. (1984), Cell 37, 9-20.)

Todas las evidencias acumuladas en estos años acerca de la relación entre el sistema EGF-R/EGF-R ligandos y el cáncer, convierten al mismo, en un blanco muy atractivo para la inmunoterapia de cáncer.

Resultados previos han demostrado la posibilidad de realizar una inmunoterapia activa de cáncer con la vacuna basada en EGF. De hecho, se han obtenido evidencias tanto preclínicas como clínicas acerca de la inmunogenicidad y la baja toxicidad provocada por la vacunación con hrEGF unido a una proteína transportadora (González y cols.(1996), Vaccine Research 5(4), 233-243.)

- 5 EP 0 657 175 describe una composición vacunal que contienen EGF autólogo acoplado a una proteína transportadora y dicho complejo inhibe el crecimiento de tumores dependientes de EGF a través de un efecto auto inmune.

La composición vacunal descrita en EP 0 657 175, son vacunas conjugadas que contiene EGF, acoplado a una proteína transportadora (la proteína rP64k, la cadena B de la toxina de Cholera, la
10 proteína de toxoide tetánico y/o anticuerpos monoclonales) y como consecuencia se obtiene una mezcla heterogénea y poco reproducible de especies conjugadas.

El novedoso preparado vacunal descrito en la presente invención comprende como principio activo el EGF autólogo y está caracterizado por poseer una composición química homogénea y pureza definida, una inmunogenicidad potenciada, una actividad clínica sustancialmente
15 incrementada y permite disminuir sensiblemente el numero de inmunizaciones para su acción terapéutica

La disminución del contenido del antígeno autólogo en el preparado vacunal de la presente invención, sorprendentemente no disminuye, sino que provoca incrementos significativos en los títulos de anticuerpos anti EGF en humanos. La disminución del contenido de EGF y sus
20 derivados en la composición vacunal se obtuvo a través de desarrollo de un método de purificación por membrana, el cual también forma parte de esta invención

La presente invención proporciona además un preparado vacunal homogéneo y reproducible que permite incrementar el efecto clínico del mismo disminuyendo el numero de inmunizaciones, lo que brinda una gran ventaja en la terapéutica del cáncer y para el paciente, en comparación con
25 composiciones vacunales previamente descritas. La composición vacunal acorde a la presente invención puede ser empleada en conjunción con adyuvantes adecuados tales como hidróxido de aluminio o Montanide

En otro aspecto, la presente invención involucra un procedimiento sanitario para la obtención del preparado vacunal apropiado para la administración a pacientes por vía parenteral. El
30 procedimiento comprende un método adecuado de conjugación covalente del hrEGF, a la proteína transportadora rP64k y la purificación del mismo empleando membranas de Ultrafiltración en un rango de 50-100kDa. para remover las especies conjugadas biológicamente inactivas (carente de actividad inmunogénica) y otras impurezas químicas.

35

Descripción Detallada de la Invención.

La presente invención proporciona un novedoso preparado vacunal basado en el EGF autólogo, caracterizado por poseer una composición química homogénea y pureza definida, una inmunogenicidad potenciada y una actividad clínica sustancialmente incrementada.

5 Adicionalmente la presentación vacunal descrita en la presente invención brinda la posibilidad de disminuir sensiblemente el número de administraciones necesarias al paciente, cuando se requiera incrementar la dosis terapéutica, por el hecho de que esta composición vacunal se obtiene a partir de una metodología que permite alcanzar diferentes concentraciones por mililitros de las especies conjugadas hrEGF-rP64k, conocido como potencia

10 Este nuevo preparado vacunal se obtiene a partir del sorpresivo resultado de que la disminución del contenido del antígeno autólogo en la composición vacunal a través un novedoso proceso de purificación, no disminuye, sino permite incrementar significativamente la respuesta inmune contra el EGF propio en comparación con composiciones heterogéneas empleadas como vacunas basadas en el EGF.

15 El preparado vacunal obtenido a partir de la disminución del contenido del antígeno autólogo a través de la metodología de purificación por membrana de ultrafiltración tiene una composición homogénea donde las especies inmunológicamente activas (especies conjugadas hrEGF-rP64k) muestran masas molares superiores a 60kDa.. Este preparado vacunal muestra un perfil de separación cromatográfico por exclusión molecular caracterizado porque donde las especies que
20 portan actividad terapéutica de este preparado vacunal, representan más 90% del área total del cromatograma correspondiente a la preparación vacunal en su conjunto, como se muestra en la figura 4

Estudios de Espectrometría de Masas realizados para profundizar en la caracterización estructural del preparado vacunal, aportan el mapa de péptidos para dos lotes diferentes del preparado
25 vacunal, donde se aprecia gran similitud en la posición y proporción de los péptidos que aparecen (ver figura 5). La similitud entre los mapas de péptidos obtenidos a partir de ambas replicas de preparado vacunales es un indicativo del control en las condiciones en que ocurren los procedimientos de conjugación química y purificación descritas también en la presente invención. Este estudio permitió identificar la secuencia de los péptidos mayoritarios que componen el
30 presente preparado vacunal.(ver tabla 3)

Este preparado vacunal se caracteriza además por una relación de conjugación química entre las proteínas hrEGF y rP64k de (1:2), esto significa que existen 2 moléculas de hrEGF conjugada por cada molécula de rP64k

35

Metodología para obtención del preparado vacunal**Procedimiento de purificación para la disminución del contenido de EGF autólogo.**

A partir de observaciones experimentales que evidenciaron que la disminución del contenido de hrEGF en el preparado vacunal aumenta acción inmunogénica del mismo, se desarrolla un método para disminuir el contenido de hrEGF en la mezcla heterogénea de conjugados; enriqueciendo el preparado vacunal en especies conjugadas de alto peso molecular (especies inmunológicamente activas) y libre de glutaraldehído.

El procedimiento de purificación empleando membranas de ultrafiltración en un rango entre 50-100kDa desarrollado y descrito en la presente invención consta de dos etapas: En la etapa inicial se realizan sucesivos cambios de solución tampón (diafiltración) para remover el glutaraldehído y eliminar el exceso de proteína autóloga, ya sea libre o formando conjugados hrEGF-hrEGF de diferentes tallas. Durante esta etapa se realizan entre 10 y 15 cambios de solución tampón. La segunda etapa es la concentración del conjugado químico purificado, en el cual mas del 90% de su composición corresponde a la especie inmunogénica hrEGF-rP64k. Durante la etapa de concentración el volumen inicial del conjugado químico se reduce hasta lograr una concentración de proteínas final (especies conjugadas hrEGF-rP64k) en un rango entre 1- 12 mg/mL. Esta versatilidad en el rango de concentraciones del principio activo (miligramos totales de conjugados hrEGF-rP64k por mililitros) para dicho preparado vacunal brinda una gran ventaja en la terapéutica del cáncer. Esto permite incrementar la dosis de tratamiento sin que implique para el paciente un incremento en la frecuencia de inmunización y/o aumentar el número de sitios de inmunización.

Con el propósito de monitorear la calidad de la purificación del conjugado químico se evalúa el pH y la conductividad del retenido y del permeado. Se realiza también la determinación de la concentración de proteína por el método descrito por Lowry D.H. y col. J. Biol Chem 191: 495-498, 1951 y se determina el porcentaje de homogeneidad a partir del análisis cromatográfico por filtración en gel (HPLC-FG).

La singularidad de esta metodología asegura que el preparado vacunal obtenido tenga una composición homogénea y pureza definida, caracterizada por la presencia mayoritaria de las especies inmunológicamente activas: especies conjugadas hrEGF-rP64k.

Sorprendentemente, la remoción del exceso de proteína autóloga (hrEGF) libre o polimérico no provoca la reducción, sino que permite incrementar significativamente la concentración de anticuerpos anti EGF (a la dilución 1/1000), a 10 veces mas con relación a la concentración de anticuerpos alcanzada al inmunizar ratones con polímeros de hrEGF y con hrEGF libre. La reducción del contenido de proteína autóloga en la preparación vacunal provoca en pacientes incrementos de al menos 2 veces el máximo título de anticuerpos anti EGF. Este incremento del título de anticuerpos se observa aun en aquellos pacientes que reciben la mitad de la dosis (2.4 mg) por inmunización en comparación con pacientes que reciben (4.8 mg) por dosis del preparado

vacunal descrito en EP 0657 175. Estos resultados indican que el preparado vacunal, descrito en la presente invención tiene mayor actividad inmunogénica por miligramo de proteína activamente inmunogénica, comparado con otros preparados vacunales

Obtención del conjugado químico entre la proteína recombinante P64k (rP64k) y el Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (hrEGF).

A partir de la evaluación y optimización de las condiciones para la reacción de química conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k se desarrolla un método de conjugación química que requiere de una elevada proporción molar de la proteína autóloga, 10 moles de hrEGF por cada mol de rP64k para garantizar una elevada eficiencia de conjugación entre ambas durante la conjugación. El exceso necesario de proteína autóloga durante la conjugación química, para garantizar la eficiencia de la misma, se elimina seguidamente a través del método de purificación por membranas de ultrafiltración descrito anteriormente, el cual permite la obtención del preparado vacunal con elevada homogeneidad. El procedimiento descrito en la presente invención para garantizar una adecuada conjugación química entre ambas proteínas consta de un solo paso y se inicia mezclando la proteína hrEGF concentrada previamente (>6 mg/mL) y la proteína rP64k (≥ 1 mg/mL) en el reactor de conjugación. A esta mezcla proteica se le añade posteriormente la solución PBS/MgCl₂ (pH 6.8-7.2) y la solución de conjugación de glutaraldehído 0.5 %. La mezcla se mantiene en agitación constante por 2 horas a una temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La concentración final de proteína en la mezcla de reacción para el hrEGF es 0.82 mg/mL y para la proteína rP64k es 0.89 mg/mL. La concentración de proteínas totales durante la reacción de conjugación es de 2 mg/mL y la concentración final del glutaraldehído en la mezcla de reacción es de 0.05 %.

La composición vacunal acorde a la presente invención puede ser empleada en conjunción con adyuvantes adecuados, tales como hidróxido de aluminio o Montanide.

En otro aspecto, la presente invención involucra un procedimiento sanitario para la obtención del preparado vacunal, administrado por vía parenteral que minimiza las oportunidades de contaminación microbiana del preparado vacunal durante su obtención, permite realizar la metodología de purificación del conjugado químico en pocas horas y facilita el incremento del volumen del preparado vacunal a obtener entre otras ventajas.

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar más detalladamente la presente invención.

El Ejemplo 1 describe la caracterización molecular del preparado vacunal descrito en la presente invención. La caracterización molecular incluye: la identificación cromatográfica por HPLC-FG de las especies conjugadas formadas durante la reacción de conjugación, la determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k y la definición del mapa de péptidos que caracteriza a este novedoso preparado vacunal.

El Ejemplo 2 describe los bioensayos en ratón realizados para evaluar la inmunogenicidad del novedoso preparado vacunal descrito en la presente invención.

El Ejemplo 3 describe la eficacia del uso clínico del presente preparado vacunal en el tratamiento de tumores de pulmón de origen epitelial.

El Ejemplo 4 describe la obtención de preparados vacunales ajustados a diferentes potencias (miligramos totales de conjugado hrEGF-rP64k/vial), empleando la misma metodología de conjugación y purificación descrita en la presente invención.

El Ejemplo 5 muestra la remoción del glutaraldehído empleado en la reacción de conjugación, mediante la metodología de purificación del conjugado químico a través de una membrana de ultrafiltración 50kDa.

EJEMPLOS:

EJEMPLO 1: Caracterización molecular del preparado vacunal descrito en la presente invención (Preparado Vacunal A).

1.1 Caracterización cromatográfica del preparado vacunal descrito en la presente invención

Para la caracterización cromatográfica del preparado vacunal purificado por ultrafiltración se emplearon como indicadores conjugados homoligoméricos hrEGF-hrEGF y rP64k-rP64k. Los perfiles cromatográficos mostrados por los conjugados homoligoméricos (hrEGF-hrEGF y rP64k-rP64k) se compararon con el perfil cromatográfico mostrado por el conjugado químico obtenido de la reacción de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k sin purificar.

En la figura 1 se muestra el perfil del conjugado homoligomérico rP64k-rP64k y el perfil que se obtiene al realizar la conjugación química entre las proteínas hrEGF y rP64k (conjugado químico sin purificar por ultrafiltración). La zona encerrada en el círculo enmarca el área donde se encuentran las especies conjugadas hrEGF-rP64k. El perfil del conjugado rP64k-rP64k no muestra total coincidencia con el mostrado por el del conjugado químico entre las proteínas hrEGF-rP64k debido al aporte de las moléculas de hrEGF conjugadas a la rP64k.

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos después de realizar una electroforesis desnaturalizante en condiciones de reducción y Western Blot del preparado vacunal purificado por ultrafiltración. El revelado se realizó con un anticuerpo anti EGF conjugado con fosfatasa alcalina. El EGF es una proteína de peso molecular aparente de 6kDa por consiguiente debe localizarse en la zona inferior del gel. Su identificación mediante inmunodetección con anticuerpos anti-EGF en la zona correspondiente a las proteínas de peso molecular aparente superiores a 6 kDa confirma que existen moléculas de hrEGF unidas a la rP64k en la zona del gel correspondiente a las especies conjugadas hrEGF-rP64k.

Cuando se compara el perfil del conjugado químico hrEGF-rP64 sin purificar y el perfil obtenido para el conjugado homoligomérico hrEGF-hrEGF se puede apreciar que existe una correspondencia entre ambos perfiles. Esta evidencia confirma que después del valle se encuentra la zona que corresponde a las especies de hrEGF conjugadas entre si (polímeros de hrEGF) y de moléculas de hrEGF libre (Figura 3).

El perfil cromatográfico por exclusión molecular (ver figura 4) del preparado vacunal objeto de la presente invención muestra que el área correspondiente a las especies conjugadas hrEGF-rP64k constituyen mas del 90% de área total del cromatograma (zona sombrada) evidenciando la elevada homogeneidad de la composición vacunal descrita.

5

1.2. Determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k en el preparado vacunal descrito en la presente invención.

Con el objetivo de determinar la razón de conjugación en que se encuentran el hrEGF y la rP64k en el preparado vacunal se determinaron los moles presentes de cada una de sus proteínas constituyentes. Para esto se tomó un preparado vacunal obtenido a partir de un proceso de purificación con membrana de ultrafiltración 50 kDa y se colectó la fracción cromatográfica correspondiente a las especies conjugadas hrEGF-rP64k. Estas fracciones fueron sometidas a análisis de aminoácidos.

10

La determinación de la razón de conjugación se realizó por 2 métodos.

15

1. Un método se basó en la estimación de la cantidad de Fenilalanina (Phe) y Treonina (Thr) en el preparado vacunal (aminoácidos solo presentes en la molécula de rP64k). Las cantidades de estos aminoácidos se usaron para determinar la cantidad de rP64k. A partir de esta última, y teniendo en cuenta la cantidad total de aminoácidos de la mezcla, se determinó la cantidad de EGF.

20

2. El otro método se basó en la determinación directa de las cantidades relativas de cada proteína, utilizando la secuencia de aminoácidos y basado en la cuantificación de los aminoácidos Asparagina+Aspártico (Asx), Glutamina + Glutámico (Glx), Glicina (Gly) y Alanina (Ala) (residuos altamente estables a la hidrólisis ácida y que comúnmente se usan en la cuantificación de proteínas).

25

Los resultados obtenidos por cada método se muestran a continuación en las tablas 1 y 2.

Cantidad media de rP64k	Cantidad media de hrEGF	Razón media de conjugación
12,07 nmoles	23,13 nmoles	1,92

Tabla 1: Determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k realizando la determinación de composición aminoacídica del preparado vacunal purificado por ultrafiltración, basándose en el método de determinación de la cantidad de Fenilalanina (Phe) y Treonina (Thr)

30

Proteína	Cantidad de proteína	Razón de conjugación
rP64k	12,04 nmoles	2,00
hrEGF	24,05 nmoles	

Tabla 2: Determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k realizando la determinación de composición aminoacídica del preparado vacunal purificado por ultrafiltración, basándose en el método de determinación de las cantidades relativas de los aminoácidos Asparagina+Aspártico (Asx), Glutamina + Glutámico (Glx), Glicina (Gly) y Alanina (Ala)

Los resultados obtenidos por ambos métodos muestran correspondencia en la estimación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF:rP64k para el preparado vacunal descrito en la presente invención. La razón de conjugación calculada fue de (1:2), esto significa 2 moléculas de hrEGF por cada molécula de rP64k

1.3. Definición del mapa de péptidos que caracteriza al preparado vacunal descrito en la presente invención.

Con el objetivo de caracterizar estructuralmente el preparado vacunal que se presenta en la presente invención y evidenciar la reproducibilidad en la obtención del mismo se desarrolló y caracterizó el mapa de péptidos obtenido tras la digestión de las fracciones conjugadas hrEGF-rP64k con la endoproteasa Glu-C. Cada una de las fracciones del mapa obtenido fue identificada y secuenciada por Espectrometría de Masas

La figura 5 muestra los mapas de péptidos obtenidos a partir de dos preparado vacunales obtenidos independientemente, donde se aprecia gran similitud en los péptidos que aparecen y la proporción existente de cada uno de ellos. La reproducibilidad entre los mapas de péptidos obtenidos a partir de ambos preparado vacunales es un indicativo del control que existe sobre las condiciones en la que ocurren los procedimientos de conjugación química y purificación descritas también en la presente invención.

La identificación de los péptidos contenidos en cada fracción del mapa se obtuvo por análisis de cada una de ellas por el método MALDI (siglas en Ingles de Matrix assisted Laser desorption_ionization/ Ionización_desorción de matriz asistida por Láser) y por el método ESI-MS (siglas en ingles de Electrospray Ionization/ Electronebulización por ionización). En la tabla 3 se muestra la secuencia de los péptidos mayoritarios.

Pico	Péptidos
HG05	LDID QAAPTGE
HG06	SIGMAAE AEGTAAAPKAE
HG08	AEGTAAAPKAE
HG09	KISE SIGMAAE
HG11	AAAAPAQEAPKAA

Pico	Péptidos
	GANAPKEPQRYD
HG12	SIGMAAE
HG14	VKVKVGDKISE
HG15	VAWVGE
HG16	VAWVGETE VSLTAGDAYE
HG17	VCLAIE
HG18	VRHLAANGIKYPEPE
HG19	AAAAPAEAPKAAAPAPQAAQFG VRHLAANGIKYPEPE
HG20	LKVPDIGGHE RVIPGVAYTSPE TGRIIGGGIVGPN VRHLAANGIKYPEPE
HG21	KAGVAVTDRGFIE LIFDAE GGPGGYSAFAAADE
HG22	ARVIPGVAYTSPE GLKVAIVE
HG23	AAAAPAEAPKAAAPAPQAAQFGGSADAEY D MGCDAADIGKTIHPHPTLGE PKEPQRYDAVLVAAGR
HG24	NVDIIAVE YDVVVLG
HG25	AVLVAAGRAPNGKLISAE MGCDAADIGKTIHPHPTLGE TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE
HG26	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE VRHLAANGIKYPEPELD
HG27	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE RCQYRDLKWE
HG28	GGLIVVVE
HG29	GGLIVVVE

Pico	Péptidos
	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE YRFDNIMVNTKTVAVEPKED
HG30	AIGDIVGQPMLAHKAVHE AIGDIVGQPMLAHKAVHE
HG31	ALDKYACNCVVG YIGE ALDKYACNCVVG YIGE
HG32	ARVIPGVAYTSPE LDIDMLRAY MDVPAEVAGVVKE
HG33	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE ALDKYACNCVVG YIGE GYCLHDGVCMYIE RCQYRDLKWW E
HG34	NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE
HG35	GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE
HG36	GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE VIDEVRHLAANGIKYPE
HG37	MGTVYSTLGSRLDVVE
HG38	IIGGGIIGLE MDVPAEVAGVVKEVK NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE
HG39	VVLGGGPGGYSAAFAAADE
HG40	MGTVYSTLGSRLDVVE
HG41	LKVPDIGGHENVDIIAVE
HG42	RCQYRDLKWWEL
HG43	VDKQMRTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE ASGRAIANGCDNGFTKLIFDAE
HG44	VDKQMRTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE
HG47	YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE AIANGCDNGFTKLIFDAE
HG48	RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAAVIDE

Pico	Péptidos
HG49	VNVGDTIAVDDTLITLD RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAAVIDE YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE IVGQPMLAHKAVHEGHVAAENCAGHKAYFD NGFTKLIFDAETGRIIGGGIVGPNGGDMIGE
HG50	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGEVCIAIEMGCD
HG51	RCQYRDLKWWEL

Tabla 3. Composición aminoacídica de los péptidos mayoritarios obtenidos tras la digestión de las fracciones conjugadas EGF-P64k con la endoproteasa Glu-C. La composición aminoacídica se determinó por MALDI y ESI-MS.

5

EJEMPLO 2.

Inmunogenicidad del preparado vacunal descrito en la presente invención.

En este ejemplo se describe el ensayo de actividad biológica realizado para evaluar la inmunogenicidad del preparado vacunal descrito anteriormente (Preparado Vacunal A) comparativamente con un preparado vacunal descrito en EP 0657 175, nombrado (Preparado Vacunal B)

10

Para el ensayo se realizó la inoculación de 10 ratones con una única dosis de 200 µL de una emulsión agua en aceite (50/50 % v/v) de los inmunógenos (preparado vacunal convencional obtenido por diálisis, preparado vacunal obtenido por purificación con membrana de ultrafiltración y el permeado obtenido del proceso de purificación por UF/DF, donde se encuentran las especies conjugadas hrEGF-hrEGF) con el adyuvante Montanide ISA 51. La dosis de proteína aplicada para cada inmunógeno se refiere en la tabla 4.

15

A los 14 días siguientes a la inoculación se realizó la extracción del suero de los animales y la evaluación del título de anticuerpos anti-EGF mediante un ELISA. El criterio de positividad de ensayo fue que la densidad óptica medida a 405 nm fuera más de dos veces la media obtenida para el blanco de placa. El blanco de placa se obtiene cuando se adiciona al pocillo tampón de bloqueo en lugar de muestra de suero anti-EGF. La prueba de Mann-Whitney aplicada al análisis de los datos, se realizó utilizando un programa estadístico.

20

Inmunógenos	Concentración de proteínas (Lowry)
Preparado Vacunal A	1.5 mg/mL
Preparado Vacunal B	1.5 mg/mL
Conjugados poliméricos de hrEGF y hrEGF libre) obtenido de la purificación por UF/DF del Preparado Vacunal A	0.6 mg/mL

Tabla 4: Inmunógenos evaluados y la concentración de proteínas a ser inoculado por animal según corresponda para el ensayo de actividad biológica.

5 En la figura 6 se muestran los resultados del ensayo de actividad biológica como evidencia de la actividad inmunogénica de cada inmunógeno evaluado. Los componentes del inmunógeno correspondientes a los conjugados poliméricos de hrEGF y hrEGF libre), no muestran actividad biológica relevante, pues su respuesta está al nivel del criterio de positividad del ensayo o inferior. Estos resultados verifican la hipótesis de que el EGF por si mismo no induce respuesta

10 inmunogénica

El análisis estadístico de todos los resultados al aplicar el test de " Mann-Whitney Test" (ver tabla 5) mostró diferencias altamente significativas para los títulos de anticuerpo anti EGF 1/1000 con $p=0.0004$ y para el título 1/100 con $p=0.0006$ del grupo de animales inoculados con el Preparado Vacunal A con respecto a los títulos alcanzados para el grupo de animales inoculados con el

15 Preparado Vacunal B. Esto indica que el Preparado Vacunal A, purificado mediante membrana de ultrafiltración tiene mayor actividad inmunogénica por miligramo de proteína que el Preparado Vacunal B, obtenido por el método de purificación basado en membrana de diálisis.

El Preparado Vacunal A produce un incremento de la concentración de anticuerpos anti EGF (a la dilución 1/1000) 10 veces mayor con relación al alcanzado al inmunizar con el conjugado

20 correspondiente a los polímeros de hrEGF y hrEGF libre. Con relación al preparado vacunal descrito previamente en EP 0657175 el preparado vacunal descrito en la presente invención produjo un incremento 2 veces mayor de la concentración de anticuerpos anti EGF

25

30

Análisis estadístico de Títulos de anticuerpo anti EGF (1/1000) en suero de ratón

Mann-Whitney Test and CI: G1 1/1000; G3 1/1000

		N	Median
G1 (Preparado Vacunal B)	1/1000	20	0,4300
G3 (Preparado vacunal A)	1/1000	20	0,7120

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,3115
95,0 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,4500;-0,1790)
W = 278,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0004
The test is significant at 0,0004 (adjusted for ties)

Análisis estadístico de Títulos de anticuerpo anti EGF (1/100) en suero de ratón

Mann-Whitney Test and CI: G1 1/100; G3 1/100

		N	Median
G1 (Preparado vacunal convencional)	1/100	20	1,0785
G3 (Preparado vacunal por ultrafiltración)	1/100	20	1,3040

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,2590
95,0 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,4389;-0,1149)
W = 282,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0006
The test is significant at 0,0006 (adjusted for ties)

Tabla 5: Reporte estadístico de Test de Mann-Whitney empleado para evaluar la inmunogenicidad de ambos preparados vacunales a través del titulo de anticuerpo antiEGF en el suero de ratones.

EJEMPLO 3.

Evaluación de la eficacia del uso clínico del preparado vacunal descrito en la presente invención en el tratamiento de tumores de pulmón de origen epitelial.

El objetivo de este ejemplo es evaluar en pacientes la inmunogenicidad producida por el Preparado Vacunal A en comparación con la inmunogenicidad lograda por el Preparado Vacunal B obtenido por el método de purificación por diálisis

En este estudio se trataron pacientes portadores de tumores de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzado. Se definieron para el estudio 2 grupos de pacientes (pacientes vacunados con el Preparado Vacunal B y pacientes vacunados con el Preparado Vacunal A, descrito en la presente invención. La dosis de preparado vacunal aplicada por paciente para cada grupo fue la siguiente: los pacientes vacunados con el Preparado Vacunal B recibieron 1.2 mg de proteína total por sitio de inmunización, los pacientes vacunados con el Preparado Vacunal A recibieron 0.6 mg de proteínas totales por sitio de inmunización. Para ambos grupos los sitios de inmunización fueron 4. Todos los pacientes recibieron terapia oncoespecífica, al menos 4 semanas antes de

iniciar el ensayo. Las inmunizaciones se realizaron por vía intramuscular, y se continuaron sucediendo 1 vez de manera mensual.

La respuesta inmune humoral de ambos grupos de pacientes se evaluó a través de la obtención del suero sanguíneo. La variable de valoración fundamental de los resultados fue el título de anticuerpo específico contra el EGF. Este parámetro se determinó por medio de un sistema ELISA. Los valores positivos fueron aquellas lecturas de densidad óptica que estuvieron 2 veces por encima del valor del control negativo. El título de anticuerpo reportado significa la mayor dilución de los sueros positivos.

El análisis de la respuesta inmune para los pacientes integrantes de cada grupo representado en la tabla 6 demostró que la media geométrica del título de anticuerpos máximo para el grupo de paciente inmunizados con el Preparado Vacunal A corresponde a 1:56421, mientras que para el grupo de pacientes inmunizados con el Preparado Vacunal B la media geométrica del título de anticuerpo máximo fue de 1:23515. Esto significa que el preparado vacunal descrito en la presente invención produjo un incremento 2 veces mayor de la media geométrica del título de anticuerpos anti EGF máximo con relación al alcanzado con el preparado vacunal B.

Históricamente los pacientes no inmunizados muestran un título anti-EGF autólogo de 1:500. Por lo tanto el preparado vacunal descrito en la presente invención (Preparado Vacunal A) provoca un incremento de al menos 100 veces el título de anticuerpos anti-EGF en sujetos inmunizados

	Total de Pacientes	Media Geométrica ²⁰
Preparado Vacunal A	11	56421
Preparado Vacunal B	9	23515

Tabla 6.
Resultado
del

análisis de la media geométrica de la inmunogenicidad de ambos preparados vacunales medido a través del título de anticuerpos anti-EGF en el suero de los pacientes.

Es importante remarcar que el grupo de pacientes inmunizados con el Preparado Vacunal A, descrito en la presente invención, mostraron una media geométrica superior del título de anticuerpo anti-EGF recibiendo la mitad de la cantidad de proteínas totales por inmunización (2.4 mg) que la recibida por el grupo de pacientes inmunizados con el Preparado Vacunal B, que correspondió con 4,8mg de proteínas totales, lo que constituye un resultado sorprendente.

Estos resultados evidencian que el exceso de proteína autóloga hrEGF, ya sea en forma de polímeros o de forma libre, no aporta más inmunogenicidad al preparado vacunal, sino diluye la acción inmunogénica del conjugado químico hrEGF-rP64k.

EJEMPLO 4:

Obtención del preparado vacunal descrito en la presente invención ajustado a diferentes potencias (concentración de proteínas totales por vial).

Con el propósito de demostrar la capacidad de obtener preparados vacunales con diferentes potencias (concentraciones de proteínas totales por vial) se realizó la metodología de purificación como se describe en los a continuación:

Ensayo 1: Al concluir la diafiltración se concentró el conjugado químico purificado hasta una concentración final de proteínas de 2 mg/mL.

Ensayo 2: Al concluir la diafiltración se concentró el conjugado químico purificado hasta una concentración final de proteínas de 5 mg/mL.

Ensayo 3: Al concluir la diafiltración se concentró el conjugado químico purificado hasta una concentración final de proteínas de 12 mg/mL.

En todos los ensayos el volumen total de conjugado químico empleado fue 1500 mL, se opero a una presión transmembrana de 1,5 bar y se realizaron 7 cambios de solución tampón durante la diafiltración. Para la realización de esta evaluación se establecieron dos criterios de selección: El primero fue alcanzar un porciento homogeneidad del preparado vacunal > 80%. El segundo criterio fue la no presencia de precipitados de proteínas durante la operación de purificación.

Los resultados presentados en la tabla 7 muestran la obtención de preparados vacunales ajustados a diferentes concentraciones de proteínas por mililitro, garantizando elevados niveles de homogeneidad (90.92 %,96.79 % y, 95.50 % de especies conjugadas hrEGF- rP64k) y sin producir precipitación de proteínas en los mismos.

Concentración Proteína	Porciento de homogeneidad del preparado vacunal
2 mg/mL	92 00%
5 mg/mL	96.79 %
12 mg/mL	95.50 %

Tabla 7: Valores correspondientes al porciento de homogeneidad en los preparados vacunales ajustados a diferentes concentraciones finales de proteínas,

EJEMPLO 5:

Remoción de glutaraldehído en el preparado vacunal descrito en la presente inversión.

Para evaluar la remoción del agente conjugante (glutaraldehído) se cuantificó el contenido de glutaraldehído residual en el Preparado Vacunal B y en el Preparado Vacunal A, mediante un método de separación cromatográfica por fase reversa (HPLC-RP) empleando una columna C-8. Este método requirió primeramente, la precipitación de la proteína contenida en las muestras con ácido perclórico y después una reacción con fenilhidracina.

La figura 7 muestra que el contenido residual de esta impureza presente en ambos preparados vacunales fue menor, de 0.2 ug/mL o menor de 0.002 ppm, (concentración límite superior establecida para esta impureza) partiendo de una concentración inicial de 530 mg/mL ó 530 ppm. Aun cuando ambos preparados cumplen con la especificación establecida para esta impureza, la figura 7 ilustra que el preparado vacunal A obtenido de aplicar el método de purificación del conjugado químico por membranas de Ultrafiltración, posee un contenido inferior de glutaraldehído, lo que le aporta gran seguridad para el paciente a dicho preparado vacunal

Breve Descripción de las Figuras.

Figura 1. Se muestra la superposición del cromatograma de un conjugado homoligomérico rP64k-rP64k y del cromatograma de un conjugado químico EGF-P64k sin purificar. Encerrado en el círculo se muestra la coincidencia de los perfiles entre ambos cromatogramas. El eje X presenta el tiempo al cual eluye cada componente de la muestra y el eje Y representa el valor de intensidad a 216 nm de cada componente de la muestra, como indicador de la concentración de proteína en la misma.

Figura 2. Inmunodetección con un anticuerpo anti EGF conjugado con fosfatasa alcalina posterior a la separación electroforética en SDS- PAGE para preparado vacunal obtenido por ultrafiltración. Línea 1: Marcador de peso molecular, Línea 2 Preparado vacunal

Figura 3. Se muestra la superposición del cromatograma correspondiente al conjugado homoligomérico hrEGF-hrEGF y del cromatograma de un conjugado químico hrEGF-rP64k sin purificar. Encerrado en el círculo se muestra la coincidencia de especies entre ambos cromatogramas. . El eje X presenta el tiempo al cual eluye cada componente de la muestra y el eje Y representa el valor de intensidad a 216 nm de cada componente en la muestra, como indicador de la concentración de proteína en la misma.

Figura 4. Perfil cromatográfico correspondiente al preparado vacunal descrito en la presente invención. El área sombreada se corresponde con las especies conjugadas hrEGF-rP64k. El eje X presenta el tiempo al cual eluye cada fracción y el eje Y representa el valor de intensidad a 216 nm de cada componente en la muestra, como indicador de la concentración de proteína en la misma.

Figura 5. Mapa peptídico de la fracción cromatográfica correspondiente al conjugado hrEGF-rP64k. Se presentan los resultados obtenidos para dos preparado vacunales purificados independientemente a través de una membrana de ultrafiltración. El eje de las X representa el tiempo y el eje de las Y representa las unidades de mili intensidad.

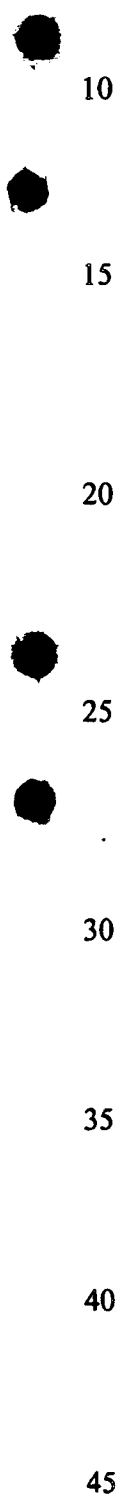
Figura 6: Títulos de anticuerpos anti EGF en ratones inmunizados con varios inmunógenos: preparado vacunal convencional, preparado vacunal purificado por ultrafiltración y el permeado procedente del método de purificación por ultrafiltración del preparado vacunal El eje X corresponde a las diluciones realizadas al suero obtenido de cada animal y el eje Y representa el

WO 2009/003425

PCT/CU2008/000005

valor de densidad óptica a 405 nm de cada muestra como indicador de la concentración de proteína en la misma.

Figura 7: Perfil cromatográfico por HPLC-RP obtenido durante la cuantificación del contenido de glutaraldehído residual para el preparado vacunal obtenido a partir del método de purificación por empleando las membranas de ultrafiltración 50kDa (Preparado Vacunal A) y para el preparado vacunal obtenido empleando el método de purificación por membrana de diálisis (Preparado Vacunal B).



REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición vacunal cuyo principio activo comprende un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque cada molécula de la proteína rP64K tiene enlazada dos moléculas de hrEGF
2. Una composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque el conjugado proteico hrEGF-rP64k está en una proporción de 12.04 nmoles de proteína rP64k por 24.05 nmoles de hrEGF.
- 10 3. Una composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque es una mezcla homogénea de hrEGF-rP64k libre de especies moleculares como polímeros de hrEGF o hrEGF libre.
4. La composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque la mezcla homogénea de hrEGF-rP64k esta libre de glutaraldehído.
- 15 5. La composición vacunal según reivindicación 1, caracterizada porque adicionalmente contiene un adyuvante apropiado, seleccionado del grupo que comprende hidróxido de aluminio o Montanide.
6. La composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque contiene como adyuvante Montanide.
- 20 7. La composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque contiene como adyuvante hidróxido de aluminio.
8. La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 10 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero mamíferos inmunizados.
- 25 9. La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 10 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero de humanos.
10. La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 100 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero de humanos.
- 30 11. Un procedimiento para la obtención de forma sanitaria de la composición vacunal de la reivindicación 1 que comprende un procedimiento adecuado de conjugación covalente del EGF, a la proteína transportadora rP64k y la purificación del mismo, empleando una membrana de Ultrafiltración para remover las especies conjugadas biológicamente inactivas y otras impurezas químicas.
- 35 12. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 11, caracterizado porque dicha reacción de conjugación se inicia mezclando la proteína hrEGF concentrada previamente (>6 mg/mL) y la proteína rP64k (≥ 1 mg/mL) en el reactor de conjugación, a dicha mezcla proteica se le añade la solución PBS/MgCl₂ (pH 6.8-7.2) y la solución de conjugación de glutaraldehído 0.5 %, finalmente, la mezcla se mantiene en agitación constante por 2 horas a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura.
- 40 13. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 12, caracterizado porque las condiciones de conjugación de las proteínas hrEGF y rP64k

garantizan una relación de conjugación de dos moléculas de hrEGF por cada molécula de rP64k.

- 5 14. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 11, caracterizado porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación covalente se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana que puede estar en el rango entre 50 y 100 kDa.
- 10 15. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 14, caracterizada porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación química se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de 50 kDa.
- 15 16. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 14, caracterizado porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación química se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de 100 kDa.
- 20 17. La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque esta purificada por el método de la reivindicación 15.
- 25 18. La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque esta purificada por el método de la reivindicación 16.
- 30 19. La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque la concentración final de proteína total del preparado vacunal se ajusta en un rango entre 1 - 12 mg/mL.
- 35 20. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 17 para la fabricación de un reactivo útil para desencadenar una respuesta inmune contra el EGF humano.
- 40 21. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 18 para la fabricación de un reactivo útil para desencadenar una respuesta inmune contra el EGF humano.
22. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 17 para la fabricación de un reactivo útil en el tratamiento de tumores de origen epitelial.
23. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 18 para la fabricación de un reactivo útil en el tratamiento de tumores de origen epitelial.

1/4

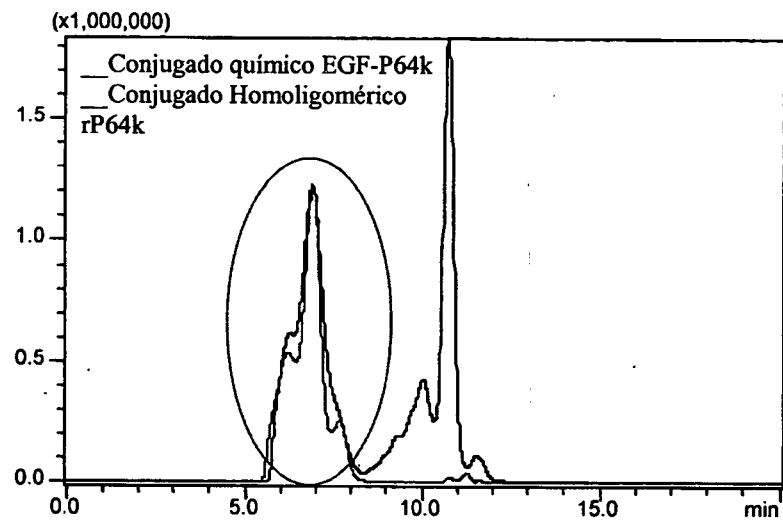


Figura 1

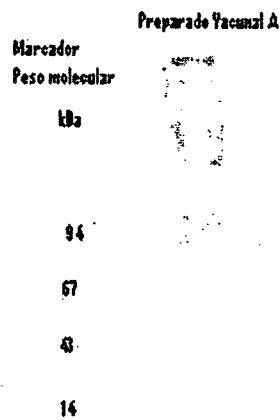


Figura 2

2/4

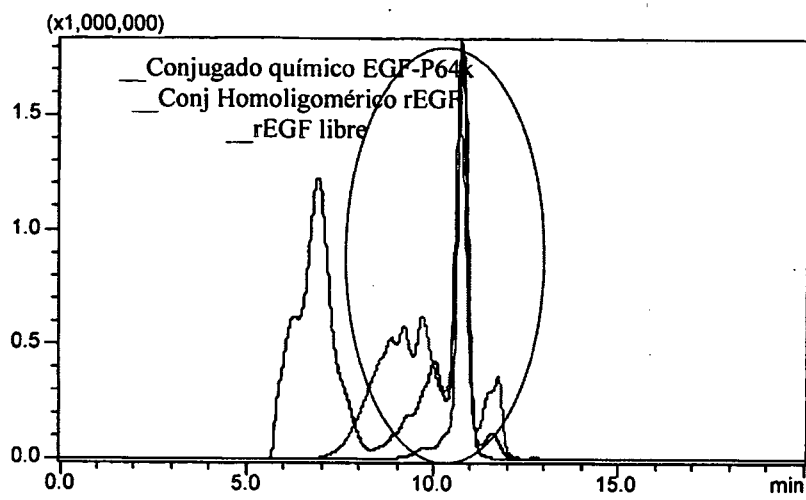


Figura 3

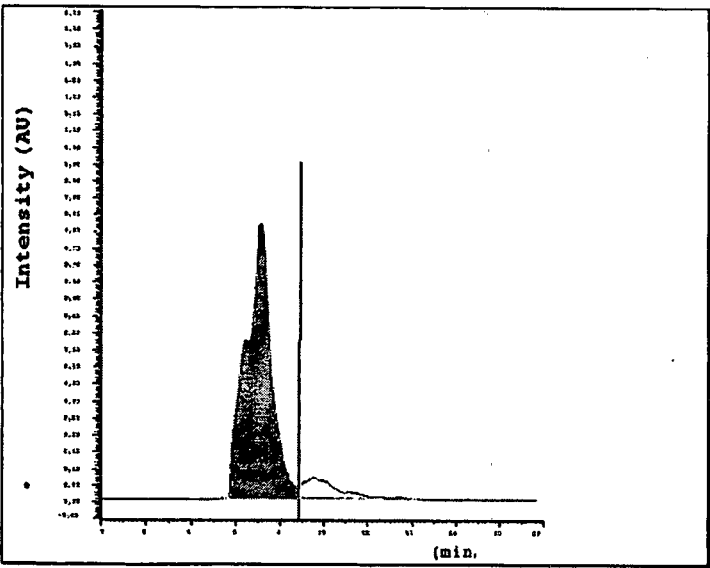


Figura 4.

3/4

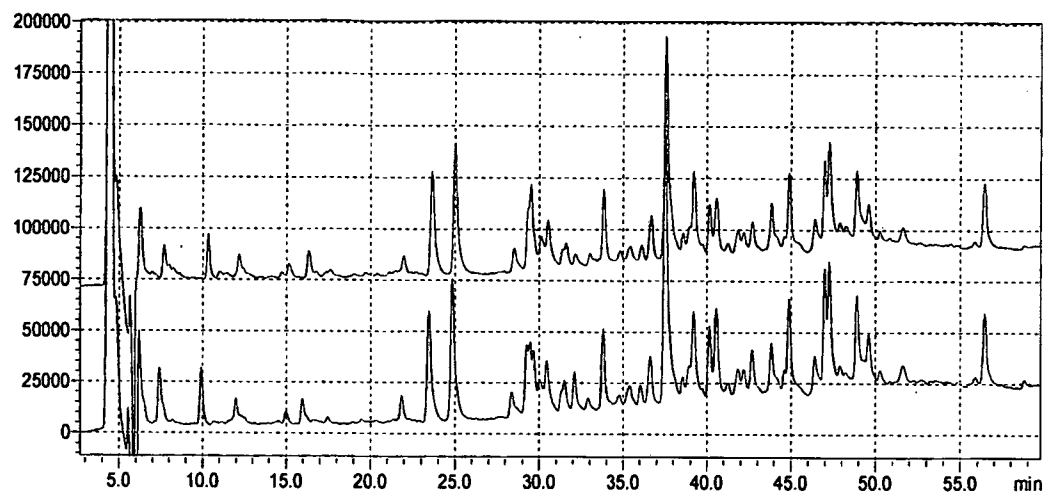


Figura 5

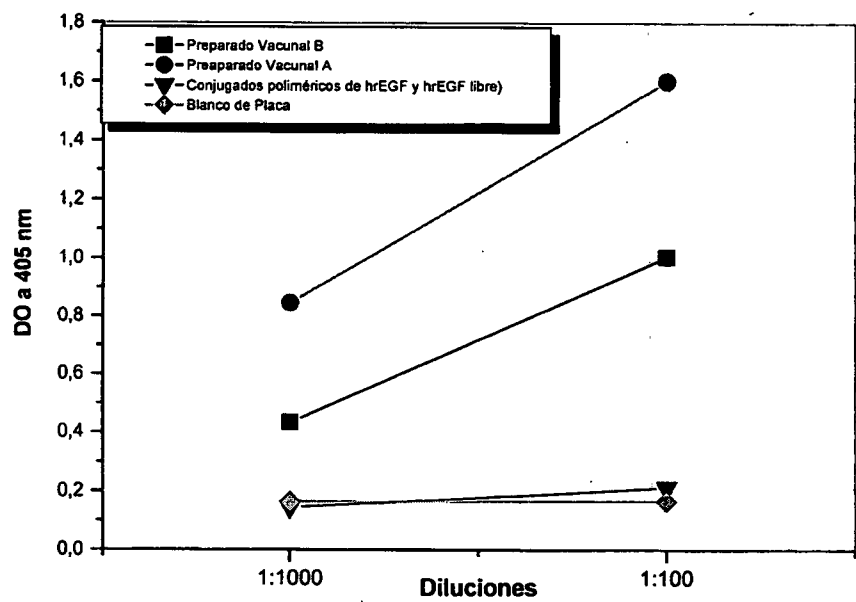


Figura 6

4/4

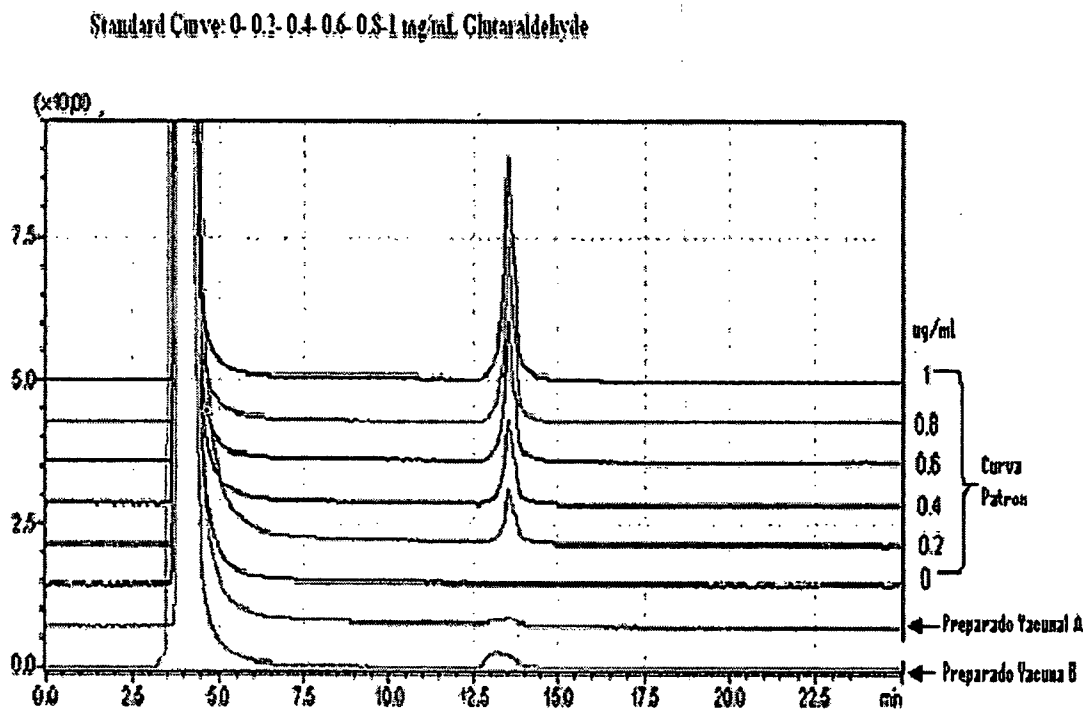


Figura 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2008/000005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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 practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONZÁLEZ, G. et al., "Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials.", HUM. VACCIN., 2007 Jan-Feb, Vol. 3, No. 1, pages 8-13. Methods, Results, Tables 1 and 2, figure 1.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial.", ANN. ONCOL., 1998, Vol. 9, No. 4, pages 431-435. Methods.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy.", ANN. ONCOL., 2003, Vol. 14, No. 3, pages 461-466. Methods.	1-23

☒ 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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 October 2008 (06.10.2008)

Date of mailing of the international search report

(09/10/2008)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J.L. Vizán Arroyo

Telephone No. +34 91 349 85 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU 2008/000005

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMOS, T.C. et al., "Treatment of NSCLC patients with an EGF-based cancer vaccine: report of a Phase I trial.", CANCER. BIOL. THER., 2006, Vol. 5, No. 2, pages 145-149. Material and Methods.	1-23
A	WO 0245747 A1 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR CUBA, Y OTROS) 13.06.2002, Page 6, lines 26-32; Examples 1 and 2.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ CU 2008/000005

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0245747 A	13.06.2002	UY 27058 A	22.03.2002
		CA 2431199 A	13.06.2002
		AU 2152102 A	18.06.2002
		US 2002160014 A	31.10.2002
		AR 031641 A	24.09.2003
		EP 1350521 A	08.10.2003
		EP 20010999388	06.12.2001
		BR 0116010 A	06.01.2004
		ZA 200304415 A	07.07.2004
		MXPA 03005030 A	10.09.2004
		NZ 526284 A	26.11.2004
		CN 1592636 A	09.03.2005
		CN 1326566 C	18.07.2007
		JP 2005519023 T	30.06.2005
		US 2006188497 A	24.08.2006
		AU 2002221521 B	04.01.2007
		HK 1073244 A	14.03.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/ CU 2008/000005
--

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ CU 2008/000005

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
Ver hoja adicional		
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)		
A61K		
Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)		
INVENES,EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GONZÁLEZ, G. et al., "Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials.", HUM. VACCIN., 2007 Jan-Feb, Vol. 3, No. 1, páginas 8-13. Métodos, Resultados, Tablas 1 y 2, Figura 1.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial.", ANN. ONCOL., 1998, Vol. 9, No. 4, páginas 431-435. Métodos.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy.", ANN. ONCOL., 2003, Vol. 14, No. 3, páginas 461-466. Métodos.	1-23
☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional	
06 Octubre 2008 (06.10.2008)	09 de Octubre de 2008 (09/10/2008)	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado	
O.E.P.M.	J.L. Vizán Arroyo	
Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.		
N° de fax 34 91 3495304	N° de teléfono +34 91 349 85 73	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ CU 2008/000005

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

Obtención de un preparado vacunal homogéneo para el tratamiento del cáncer.

Sector Técnico:

La presente invención se relaciona con la biotecnología, y más específicamente con el campo de la salud humana. En una representación, la presente invención describe vacunas protectoras y/o terapéuticas para cáncer, y particularmente proporciona composiciones vacunales que permiten el incremento significativo de la respuesta inmunitaria contra el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Factor de Crecimiento cuya relevancia oncológica ha sido ampliamente demostrada para el crecimiento de tumores fundamentalmente de origen epitelial.

Técnica Anterior:

El sistema del receptor de EGF (R-EGF) y sus ligandos constituye un complejo molecular cuya interacción regula de forma específica el crecimiento celular y ha sido demostrado su impacto en el crecimiento descontrolado de tumores de origen epitelial.

En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrinós y autocrinós de activación del (R-EGF), esta dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

El EGF, es un polipéptido de 53 aminoácidos, con un peso molecular aparente de 6045 Da. Este polipéptido fue aislado y purificado por primera vez por Cohen S., J. Biol. Chem. (1962) 237, 1. 555).

El EGF forma parte de la familia de ligandos del R-EGF, esta familia está constituida por proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Los otros miembros de esta familia son: TGF, anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epiregulina. Por otra parte la familia de los poxvirus incluye proteínas relacionadas con el EGF, dentro de ellas la más caracterizada es el factor de crecimiento de vaccinia virus (VGF).

Todas estas moléculas son capaces de unirse y activar al (R-EGF), así que son conocidas como ligandos del mismo y juegan un rol en el crecimiento de células normales y neoplásicas en menor o mayor grado.

El R-EGF es una glicoproteína de 170 kDa aproximadamente, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular de este receptor esta asociado con la actividad de proteínas tirosinas quinasas que muestran homología estructural con el producto del oncogen v-erb-B, lo que muestra una relación con el proceso de transformación maligna (Heldin C.H. (1984), Cell 37, 9-20.)

Todas las evidencias acumuladas en estos años acerca de la relación entre el sistema EGF-R/EGF-R ligandos y el cáncer, convierten al mismo, en un blanco muy atractivo para la inmunoterapia de cáncer.

Resultados previos han demostrado la posibilidad de realizar una inmunoterapia activa de cáncer con la vacuna basada en EGF. De hecho, se han obtenido evidencias tanto preclínicas como clínicas acerca de la inmunogenicidad y la baja toxicidad provocada por la vacunación con hrEGF unido a una proteína transportadora (González y cols.(1996), Vaccine Research 5(4), 233-243.)

5 EP 0 657 175 describe una composición vacunal que contienen EGF autólogo acoplado a una proteína transportadora y dicho complejo inhibe el crecimiento de tumores dependientes de EGF a través de un efecto auto inmune.

La composición vacunal descrita en EP 0 657 175, son vacunas conjugadas que contiene EGF, acoplado a una proteína transportadora (la proteína rP64k, la cadena B de la toxina de Cholera, la
10 proteína de toxoide tetánico y/o anticuerpos monoclonales) y como consecuencia se obtiene una mezcla heterogénea y poco reproducible de especies conjugadas.

El novedoso preparado vacunal descrito en la presente invención comprende como principio activo el EGF autólogo y está caracterizado por poseer una composición química homogénea y pureza definida, una inmunogenicidad potenciada, una actividad clínica sustancialmente
15 incrementada y permite disminuir sensiblemente el numero de inmunizaciones para su acción terapéutica

La disminución del contenido del antígeno autólogo en el preparado vacunal de la presente invención, sorprendentemente no disminuye, sino que provoca incrementos significativos en los títulos de anticuerpos anti EGF en humanos. La disminución del contenido de EGF y sus
20 derivados en la composición vacunal se obtuvo a través de desarrollo de un método de purificación por membrana, el cual también forma parte de esta invención

La presente invención proporciona además un preparado vacunal homogéneo y reproducible que permite incrementar el efecto clínico del mismo disminuyendo el numero de inmunizaciones, lo que brinda una gran ventaja en la terapéutica del cáncer y para el paciente, en comparación con
25 composiciones vacunales previamente descritas. La composición vacunal acorde a la presente invención puede ser empleada en conjunción con adyuvantes adecuados tales como hidróxido de aluminio o Montanide

En otro aspecto, la presente invención involucra un procedimiento sanitario para la obtención del preparado vacunal apropiado para la administración a pacientes por vía parenteral. El
30 procedimiento comprende un método adecuado de conjugación covalente del hrEGF, a la proteína transportadora rP64k y la purificación del mismo empleando membranas de Ultrafiltración en un rango de 50-100kDa. para remover las especies conjugadas biológicamente inactivas (carente de actividad inmunogénica) y otras impurezas químicas.

35

Descripción Detallada de la Invención.

La presente invención proporciona un novedoso preparado vacunal basado en el EGF autólogo, caracterizado por poseer una composición química homogénea y pureza definida, una inmunogenicidad potenciada y una actividad clínica sustancialmente incrementada.

5 Adicionalmente la presentación vacunal descrita en la presente invención brinda la posibilidad de disminuir sensiblemente el número de administraciones necesarias al paciente, cuando se requiera incrementar la dosis terapéutica, por el hecho de que esta composición vacunal se obtiene a partir de una metodología que permite alcanzar diferentes concentraciones por mililitros de las especies conjugadas hrEGF-rP64k, conocido como potencia

10 Este nuevo preparado vacunal se obtiene a partir del sorpresivo resultado de que la disminución del contenido del antígeno autólogo en la composición vacunal a través un novedoso proceso de purificación, no disminuye, sino permite incrementar significativamente la respuesta inmune contra el EGF propio en comparación con composiciones heterogéneas empleadas como vacunas basadas en el EGF.

15 El preparado vacunal obtenido a partir de la disminución del contenido del antígeno autólogo a través de la metodología de purificación por membrana de ultrafiltración tiene una composición homogénea donde las especies inmunológicamente activas (especies conjugadas hrEGF-rP64k) muestran masas molares superiores a 60kDa.. Este preparado vacunal muestra un perfil de separación cromatográfico por exclusión molecular caracterizado porque donde las especies que
20 portan actividad terapéutica de este preparado vacunal, representan más 90% del área total del cromatograma correspondiente a la preparación vacunal en su conjunto, como se muestra en la figura 4

Estudios de Espectrometría de Masas realizados para profundizar en la caracterización estructural del preparado vacunal, aportan el mapa de péptidos para dos lotes diferentes del preparado
25 vacunal, donde se aprecia gran similitud en la posición y proporción de los péptidos que aparecen (ver figura 5). La similitud entre los mapas de péptidos obtenidos a partir de ambas replicas de preparado vacunales es un indicativo del control en las condiciones en que ocurren los procedimientos de conjugación química y purificación descritas también en la presente invención. Este estudio permitió identificar la secuencia de los péptidos mayoritarios que componen el
30 presente preparado vacunal.(ver tabla 3)

Este preparado vacunal se caracteriza además por una relación de conjugación química entre las proteínas hrEGF y rP64k de (1:2), esto significa que existen 2 moléculas de hrEGF conjugada por cada molécula de rP64k

35

Metodología para obtención del preparado vacunal**Procedimiento de purificación para la disminución del contenido de EGF autólogo.**

A partir de observaciones experimentales que evidenciaron que la disminución del contenido de hrEGF en el preparado vacunal aumenta acción inmunogénica del mismo, se desarrolla un método para disminuir el contenido de hrEGF en la mezcla heterogénea de conjugados; enriqueciendo el preparado vacunal en especies conjugadas de alto peso molecular (especies inmunológicamente activas) y libre de glutaraldehído.

El procedimiento de purificación empleando membranas de ultrafiltración en un rango entre 50-100kDa desarrollado y descrito en la presente invención consta de dos etapas: En la etapa inicial se realizan sucesivos cambios de solución tampón (diafiltración) para remover el glutaraldehído y eliminar el exceso de proteína autóloga, ya sea libre o formando conjugados hrEGF-hrEGF de diferentes tallas. Durante esta etapa se realizan entre 10 y 15 cambios de solución tampón. La segunda etapa es la concentración del conjugado químico purificado, en el cual mas del 90% de su composición corresponde a la especie inmunogénica hrEGF-rP64k. Durante la etapa de concentración el volumen inicial del conjugado químico se reduce hasta lograr una concentración de proteínas final (especies conjugadas hrEGF-rP64k) en un rango entre 1- 12 mg/mL. Esta versatilidad en el rango de concentraciones del principio activo (miligramos totales de conjugados hrEGF-rP64k por mililitros) para dicho preparado vacunal brinda una gran ventaja en la terapéutica del cáncer. Esto permite incrementar la dosis de tratamiento sin que implique para el paciente un incremento en la frecuencia de inmunización y/o aumentar el número de sitios de inmunización.

Con el propósito de monitorear la calidad de la purificación del conjugado químico se evalúa el pH y la conductividad del retenido y del permeado. Se realiza también la determinación de la concentración de proteína por el método descrito por Lowry D.H. y col. J. Biol Chem 191: 495-498, 1951 y se determina el porcentaje de homogeneidad a partir del análisis cromatográfico por filtración en gel (HPLC-FG).

La singularidad de esta metodología asegura que el preparado vacunal obtenido tenga una composición homogénea y pureza definida, caracterizada por la presencia mayoritaria de las especies inmunológicamente activas: especies conjugadas hrEGF-rP64k.

Sorprendentemente, la remoción del exceso de proteína autóloga (hrEGF) libre o polimérico no provoca la reducción, sino que permite incrementar significativamente la concentración de anticuerpos anti EGF (a la dilución 1/1000), a 10 veces mas con relación a la concentración de anticuerpos alcanzada al inmunizar ratones con polímeros de hrEGF y con hrEGF libre. La reducción del contenido de proteína autóloga en la preparación vacunal provoca en pacientes incrementos de al menos 2 veces el máximo título de anticuerpos anti EGF. Este incremento del título de anticuerpos se observa aun en aquellos pacientes que reciben la mitad de la dosis (2.4 mg) por inmunización en comparación con pacientes que reciben (4.8 mg) por dosis del preparado

vacunal descrito en EP 0657 175. Estos resultados indican que el preparado vacunal, descrito en la presente invención tiene mayor actividad inmunogénica por miligramo de proteína activamente inmunogénica, comparado con otros preparados vacunales

Obtención del conjugado químico entre la proteína recombinante P64k (rP64k) y el Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (hrEGF).

A partir de la evaluación y optimización de las condiciones para la reacción de química conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k se desarrolla un método de conjugación química que requiere de una elevada proporción molar de la proteína autóloga, 10 moles de hrEGF por cada mol de rP64k para garantizar una elevada eficiencia de conjugación entre ambas durante la conjugación. El exceso necesario de proteína autóloga durante la conjugación química, para garantizar la eficiencia de la misma, se elimina seguidamente a través del método de purificación por membranas de ultrafiltración descrito anteriormente, el cual permite la obtención del preparado vacunal con elevada homogeneidad. El procedimiento descrito en la presente invención para garantizar una adecuada conjugación química entre ambas proteínas consta de un solo paso y se inicia mezclando la proteína hrEGF concentrada previamente (>6 mg/mL) y la proteína rP64k (≥ 1 mg/mL) en el reactor de conjugación. A esta mezcla proteica se le añade posteriormente la solución PBS/MgCl₂ (pH 6.8-7.2) y la solución de conjugación de glutaraldehído 0.5 %. La mezcla se mantiene en agitación constante por 2 horas a una temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La concentración final de proteína en la mezcla de reacción para el hrEGF es 0.82 mg/mL y para la proteína rP64k es 0.89 mg/mL. La concentración de proteínas totales durante la reacción de conjugación es de 2 mg/mL y la concentración final del glutaraldehído en la mezcla de reacción es de 0.05 %. La composición vacunal acorde a la presente invención puede ser empleada en conjunción con adyuvantes adecuados, tales como hidróxido de aluminio o Montanide.

En otro aspecto, la presente invención involucra un procedimiento sanitario para la obtención del preparado vacunal, administrado por vía parenteral que minimiza las oportunidades de contaminación microbiana del preparado vacunal durante su obtención, permite realizar la metodología de purificación del conjugado químico en pocas horas y facilita el incremento del volumen del preparado vacunal a obtener entre otras ventajas.

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar más detalladamente la presente invención.

El Ejemplo 1 describe la caracterización molecular del preparado vacunal descrito en la presente invención. La caracterización molecular incluye: la identificación cromatográfica por HPLC-FG de las especies conjugadas formadas durante la reacción de conjugación, la determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k y la definición del mapa de péptidos que caracteriza a este novedoso preparado vacunal.

El Ejemplo 2 describe los bioensayos en ratón realizados para evaluar la inmunogenicidad del novedoso preparado vacunal descrito en la presente invención.

El Ejemplo 3 describe la eficacia del uso clínico del presente preparado vacunal en el tratamiento de tumores de pulmón de origen epitelial.

El Ejemplo 4 describe la obtención de preparados vacunales ajustados a diferentes potencias (miligramos totales de conjugado hrEGF-rP64k/vial), empleando la misma metodología de conjugación y purificación descrita en la presente invención.

El Ejemplo 5 muestra la remoción del glutaraldehído empleado en la reacción de conjugación, mediante la metodología de purificación del conjugado químico a través de una membrana de ultrafiltración 50kDa.

10 EJEMPLOS:

EJEMPLO 1: Caracterización molecular del preparado vacunal descrito en la presente invención (Preparado Vacunal A).

1.1 Caracterización cromatográfica del preparado vacunal descrito en la presente invención

Para la caracterización cromatográfica del preparado vacunal purificado por ultrafiltración se emplearon como indicadores conjugados homoligoméricos hrEGF-hrEGF y rP64k-rP64k. Los perfiles cromatográficos mostrados por los conjugados homoligoméricos (hrEGF-hrEGF y rP64k-rP64k) se compararon con el perfil cromatográfico mostrado por el conjugado químico obtenido de la reacción de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k sin purificar.

En la figura 1 se muestra el perfil del conjugado homoligomérico rP64k-rP64k y el perfil que se obtiene al realizar la conjugación química entre las proteínas hrEGF y rP64k (conjugado químico sin purificar por ultrafiltración). La zona encerrada en el círculo enmarca el área donde se encuentran las especies conjugadas hrEGF-rP64k. El perfil del conjugado rP64k-rP64k no muestra total coincidencia con el mostrado por el del conjugado químico entre las proteínas hrEGF-rP64k debido al aporte de las moléculas de hrEGF conjugadas a la rP64k.

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos después de realizar una electroforesis desnaturalizante en condiciones de reducción y Western Blot del preparado vacunal purificado por ultrafiltración. El revelado se realizó con un anticuerpo anti EGF conjugado con fosfatasa alcalina. El EGF es una proteína de peso molecular aparente de 6kDa por consiguiente debe localizarse en la zona inferior del gel. Su identificación mediante inmunodetección con anticuerpos anti-EGF en la zona correspondiente a las proteínas de peso molecular aparente superiores a 6 kDa confirma que existen moléculas de hrEGF unidas a la rP64k en la zona del gel correspondiente a las especies conjugadas hrEGF-rP64k.

Cuando se compara el perfil del conjugado químico hrEGF-rP64 sin purificar y el perfil obtenido para el conjugado homoligomérico hrEGF-hrEGF se puede apreciar que existe una correspondencia entre ambos perfiles. Esta evidencia confirma que después del valle se encuentra la zona que corresponde a las especies de hrEGF conjugadas entre si (polímeros de hrEGF) y de moléculas de hrEGF libre (Figura 3).

El perfil cromatográfico por exclusión molecular (ver figura 4) del preparado vacunal objeto de la presente invención muestra que el área correspondiente a las especies conjugadas hrEGF-rP64k constituyen mas del 90% de área total del cromatograma (zona sombrada) evidenciando la elevada homogeneidad de la composición vacunal descrita.

5

1.2. Determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k en el preparado vacunal descrito en la presente invención.

Con el objetivo de determinar la razón de conjugación en que se encuentran el hrEGF y la rP64k en el preparado vacunal se determinaron los moles presentes de cada una de sus proteínas constituyentes. Para esto se tomó un preparado vacunal obtenido a partir de un proceso de purificación con membrana de ultrafiltración 50 kDa y se colectó la fracción cromatográfica correspondiente a las especies conjugadas hrEGF-rP64k. Estas fracciones fueron sometidas a análisis de aminoácidos.

10

La determinación de la razón de conjugación se realizó por 2 métodos.

15

1. Un método se basó en la estimación de la cantidad de Fenilalanina (Phe) y Treonina (Thr) en el preparado vacunal (aminoácidos solo presentes en la molécula de rP64k). Las cantidades de estos aminoácidos se usaron para determinar la cantidad de rP64k. A partir de esta última, y teniendo en cuenta la cantidad total de aminoácidos de la mezcla, se determinó la cantidad de EGF.

20

2. El otro método se basó en la determinación directa de las cantidades relativas de cada proteína, utilizando la secuencia de aminoácidos y basado en la cuantificación de los aminoácidos Asparagina+Aspártico (Asx), Glutamina + Glutámico (Glx), Glicina (Gly) y Alanina (Ala) (residuos altamente estables a la hidrólisis ácida y que comúnmente se usan en la cuantificación de proteínas).

25

Los resultados obtenidos por cada método se muestran a continuación en las tablas 1 y 2.

Cantidad media de rP64k	Cantidad media de hrEGF	Razón media de conjugación
12,07 nmoles	23,13 nmoles	1,92

Tabla 1: Determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k realizando la determinación de composición aminoacídica del preparado vacunal purificado por ultrafiltración, basándose en el método de determinación de la cantidad de Fenilalanina (Phe) y Treonina (Thr)

30

Proteína	Cantidad de proteína	Razón de conjugación
rP64k	12,04 nmoles	2,00
hrEGF	24,05 nmoles	

Tabla 2: Determinación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64k realizando la determinación de composición aminoacídica del preparado vacunal purificado por ultrafiltración, basándose en el método de determinación de las cantidades relativas de los aminoácidos Asparagina+Aspártico (Asx), Glutamina + Glutámico (Glx), Glicina (Gly) y Alanina (Ala)

Los resultados obtenidos por ambos métodos muestran correspondencia en la estimación de la razón de conjugación entre las proteínas hrEGF:rP64k para el preparado vacunal descrito en la presente invención. La razón de conjugación calculada fue de (1:2), esto significa 2 moléculas de hrEGF por cada molécula de rP64k

1.3. Definición del mapa de péptidos que caracteriza al preparado vacunal descrito en la presente invención.

Con el objetivo de caracterizar estructuralmente el preparado vacunal que se presenta en la presente invención y evidenciar la reproducibilidad en la obtención del mismo se desarrolló y caracterizó el mapa de péptidos obtenido tras la digestión de las fracciones conjugadas hrEGF-rP64k con la endoproteasa Glu-C. Cada una de las fracciones del mapa obtenido fue identificada y secuenciada por Espectrometría de Masas

La figura 5 muestra los mapas de péptidos obtenidos a partir de dos preparado vacunales obtenidos independientemente, donde se aprecia gran similitud en los péptidos que aparecen y la proporción existente de cada uno de ellos. La reproducibilidad entre los mapas de péptidos obtenidos a partir de ambos preparado vacunales es un indicativo del control que existe sobre las condiciones en la que ocurren los procedimientos de conjugación química y purificación descritas también en la presente invención.

La identificación de los péptidos contenidos en cada fracción del mapa se obtuvo por análisis de cada una de ellas por el método MALDI (siglas en Ingles de Matrix assisted Laser desorption_ionization/ Ionización_desorción de matriz asistida por Láser) y por el método ESI-MS (siglas en ingles de Electrospray Ionization/ Electronebulización por ionización). En la tabla 3 se muestra la secuencia de los péptidos mayoritarios.

Pico	Péptidos
HG05	LDID QAAPTGE
HG06	SIGMAAE AEGTAAAPKAE
HG08	AEGTAAAPKAE
HG09	KISE SIGMAAE
HG11	AAAAPAQEAPKAA

Pico	Péptidos
	GANAPKEPQRYD
HG12	SIGMAAE
HG14	VKVKVGDKISE
HG15	VAWVGE
HG16	VAWVGETE VSLTAGDAYE
HG17	VCLAIE
HG18	VRHLAANGIKYPEPE
HG19	AAAAPAQEAPKAAAPAPQAAQFG VRHLAANGIKYPEPE
HG20	LKVPDIGGHE RVIPGVAYTSPE TGRIIGGGIVGPN VRHLAANGIKYPEPE
HG21	KAGVAVTDRGFIE LIFDAE GGPGGYSAAFAAADE
HG22	ARVIPGVAYTSPE GLKVAIVE
HG23	AAAAPAQEAPKAAAPAPQAAQFGGSADA EYD MGCDAAIDIGKTIHPHPTLGE PKEPQRYDAVLVAAGR
HG24	NVDIIAVE YDVVVLG
HG25	AVLVAAGRAPNGKLISAE MGCDAAIDIGKTIHPHPTLGE TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE
HG26	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE VRHLAANGIKYPEPELD
HG27	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE RCQYRDLKWWWE
HG28	GGLIVVVE
HG29	GGLIVVVE

Pico	Péptidos
	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE YRFDNIMVNTKTVAVEPKED
HG30	AIGDIVGQPMLAHKAVHE AIGDIVGQPMLAHKAVHE
HG31	ALDKYACNCVVG YIGE ALDKYACNCVVG YIGE
HG32	ARVIPGVAYTSPE LDIDMLRAY MDVPAEVAGVVKE
HG33	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE ALDKYACNCVVG YIGE GYCLHDGVC MYIE RCQYRDLK WWE
HG34	NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE
HG35	GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE
HG36	GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE VIDEVRHLAANGIKYPE
HG37	MGTVYSTLGSRLDVVE
HG38	IIGGGIIGLE MDVPAEVAGVVKEVK NSDSECPLSHDGYCLHDGVC MYIE
HG39	VVLGGGPGGYSAAF AADE
HG40	MGTVYSTLGSRLDVVE
HG41	LKVPDIGGHENV DIIAVE
HG42	RCQYRDLK W WEL
HG43	VDKQMRTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE ASGRAIANGCDNGFTKLIFDAE
HG44	VDKQMRTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE
HG47	YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE AIANGCDNGFTKLIFDAE
HG48	RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAAVIDE

Pico	Péptidos
HG49	VNVGDTIAVDDTLITLD RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAVIDE YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE IVGQPMLAHKAVHEGHVAAENCAGHKAYFD NGFTKLIFDAETGRIIGGGIVGPNGGDMIGE
HG50	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGEVC LAIEMGCD
HG51	RCQYRDLKWWEL

Tabla 3. Composición aminoacídica de los péptidos mayoritarios obtenidos tras la digestión de las fracciones conjugadas EGF-P64k con la endoproteasa Glu-C. La composición aminoacídica se determinó por MALDI y ESI-MS.

5

EJEMPLO 2.

Inmunogenicidad del preparado vacunal descrito en la presente invención.

En este ejemplo se describe el ensayo de actividad biológica realizado para evaluar la inmunogenicidad del preparado vacunal descrito anteriormente (Preparado Vacunal A) comparativamente con un preparado vacunal descrito en EP 0657 175. nombrado (Preparado Vacunal B)

10

Para el ensayo se realizó la inoculación de 10 ratones con una única dosis de 200 µL de una emulsión agua en aceite (50/50 % v/v) de los inmunógenos (preparado vacunal convencional obtenido por diálisis, preparado vacunal obtenido por purificación con membrana de ultrafiltración y el permeado obtenido del proceso de purificación por UF/DF, donde se encuentran las especies conjugadas hrEGF-hrEGF) con el adyuvante Montanide ISA 51. La dosis de proteína aplicada para cada inmunógeno se refiere en la tabla 4.

15

A los 14 días siguientes a la inoculación se realizó la extracción del suero de los animales y la evaluación del título de anticuerpos anti-EGF mediante un ELISA. El criterio de positividad de ensayo fue que la densidad óptica medida a 405 nm fuera más de dos veces la media obtenida para el blanco de placa. El blanco de placa se obtiene cuando se adiciona al pocillo tampón de bloqueo en lugar de muestra de suero anti-EGF. La prueba de Mann-Whitney aplicada al análisis de los datos, se realizó utilizando un programa estadístico.

20

Inmunógenos	Concentración de proteínas (Lowry)
Preparado Vacunal A	1.5 mg/mL
Preparado Vacunal B	1.5 mg/mL
Conjugados poliméricos de hrEGF y hrEGF libre) obtenido de la purificación por UF/DF del Preparado Vacunal A	0.6 mg/mL

Tabla 4: Inmunógenos evaluados y la concentración de proteínas a ser inoculado por animal según corresponda para el ensayo de actividad biológica.

5 En la figura 6 se muestran los resultados del ensayo de actividad biológica como evidencia de la actividad inmunogénica de cada inmunógeno evaluado. Los componentes del inmunógeno correspondientes a los conjugados poliméricos de hrEGF y hrEGF libre), no muestran actividad biológica relevante, pues su respuesta está al nivel del criterio de positividad del ensayo o inferior. Estos resultados verifican la hipótesis de que el EGF por si mismo no induce respuesta

10 inmunogénica

El análisis estadístico de todos los resultados al aplicar el test de " Mann-Whitney Test" (ver tabla 5) mostró diferencias altamente significativas para los títulos de anticuerpo anti EGF 1/1000 con $p=0.0004$ y para el título 1/100 con $p=0.0006$ del grupo de animales inoculados con el Preparado Vacunal A con respecto a los títulos alcanzados para el grupo de animales inoculados con el

15 Preparado Vacunal B. Esto indica que el Preparado Vacunal A, purificado mediante membrana de ultrafiltración tiene mayor actividad inmunogénica por miligramo de proteína que el Preparado Vacunal B, obtenido por el método de purificación basado en membrana de diálisis.

El Preparado Vacunal A produce un incremento de la concentración de anticuerpos anti EGF (a la dilución 1/1000) 10 veces mayor con relación al alcanzado al inmunizar con el conjugado

20 correspondiente a los polímeros de hrEGF y hrEGF libre. Con relación al preparado vacunal descrito previamente en EP 0657175 el preparado vacunal descrito en la presente invención produjo un incremento 2 veces mayor de la concentración de anticuerpos anti EGF

25

30

Análisis estadístico de Títulos de anticuerpo anti EGF (1/1000) en suero de ratón

Mann-Whitney Test and CI: G1 1/1000; G3 1/1000

		N	Median
G1 (Preparado Vacunal B)	1/1000	20	0,4300
G3 (Preparado vacunal A)	1/1000	20	0,7120

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,3115
95,0 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,4500;-0,1790)
W = 278,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0004
The test is significant at 0,0004 (adjusted for ties)

Análisis estadístico de Títulos de anticuerpo anti EGF (1/100) en suero de ratón

Mann-Whitney Test and CI: G1 1/100; G3 1/100

		N	Median
G1 (Preparado vacunal convencional)	1/100	20	1,0785
G3 (Preparado vacunal por ultrafiltración)	1/100	20	1,3040

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,2590
95,0 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,4389;-0,1149)
W = 282,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0006
The test is significant at 0,0006 (adjusted for ties)

Tabla 5: Reporte estadístico de Test de Mann-Whitney empleado para evaluar la inmunogenicidad de ambos preparados vacunales a través del titulo de anticuerpo antiEGF en el suero de ratones.

EJEMPLO 3.

Evaluación de la eficacia del uso clínico del preparado vacunal descrito en la presente invención en el tratamiento de tumores de pulmón de origen epitelial.

El objetivo de este ejemplo es evaluar en pacientes la inmunogenicidad producida por el Preparado Vacunal A en comparación con la inmunogenicidad lograda por el Preparado Vacunal B obtenido por el método de purificación por diálisis

En este estudio se trataron pacientes portadores de tumores de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzado. Se definieron para el estudio 2 grupos de pacientes (pacientes vacunados con el Preparado Vacunal B y pacientes vacunados con el Preparado Vacunal A, descrito en la presente invención. La dosis de preparado vacunal aplicada por paciente para cada grupo fue la siguiente: los pacientes vacunados con el Preparado Vacunal B recibieron 1.2 mg de proteína total por sitio de inmunización, los pacientes vacunados con el Preparado Vacunal A recibieron 0.6 mg de proteínas totales por sitio de inmunización. Para ambos grupos los sitios de inmunización fueron 4. Todos los pacientes recibieron terapia oncoespecífica, al menos 4 semanas antes de

iniciar el ensayo. Las inmunizaciones se realizaron por vía intramuscular, y se continuaron sucediendo 1 vez de manera mensual.

La respuesta inmune humoral de ambos grupos de pacientes se evaluó a través de la obtención del suero sanguíneo. La variable de valoración fundamental de los resultados fue el título de anticuerpo específico contra el EGF. Este parámetro se determinó por medio de un sistema ELISA. Los valores positivos fueron aquellas lecturas de densidad óptica que estuvieron 2 veces por encima del valor del control negativo. El título de anticuerpo reportado significa la mayor dilución de los sueros positivos.

El análisis de la respuesta inmune para los pacientes integrantes de cada grupo representado en la tabla 6 demostró que la media geométrica del título de anticuerpos máximo para el grupo de paciente inmunizados con el Preparado Vacunal A corresponde a 1:56421, mientras que para el grupo de pacientes inmunizados con el Preparado Vacunal B la media geométrica del título de anticuerpo máximo fue de 1:23515. Esto significa que el preparado vacunal descrito en la presente invención produjo un incremento 2 veces mayor de la media geométrica del título de anticuerpos anti EGF máximo con relación al alcanzado con el preparado vacunal B.

Históricamente los pacientes no inmunizados muestran un título anti-EGF autólogo de 1:500. Por lo tanto el preparado vacunal descrito en la presente invención (Preparado Vacunal A) provoca un incremento de al menos 100 veces el título de anticuerpos anti-EGF en sujetos inmunizados

	Total de Pacientes	Media Geométrica ²⁰
Preparado Vacunal A	11	56421
Preparado Vacunal B	9	23515

Tabla 6.
Resultado
del

análisis de la media geométrica de la inmunogenicidad de ambos preparados vacunales medido a través del título de anticuerpos anti-EGF en el suero de los pacientes.

Es importante remarcar que el grupo de pacientes inmunizados con el Preparado Vacunal A, descrito en la presente invención, mostraron una media geométrica superior del título de anticuerpo anti-EGF recibiendo la mitad de la cantidad de proteínas totales por inmunización (2.4 mg) que la recibida por el grupo de pacientes inmunizados con el Preparado Vacunal B, que correspondió con 4,8mg de proteínas totales, lo que constituye un resultado sorprendente.

Estos resultados evidencian que el exceso de proteína autóloga hrEGF, ya sea en forma de polímeros o de forma libre, no aporta más inmunogenicidad al preparado vacunal, sino diluye la acción inmunogénica del conjugado químico hrEGF-rP64k.

EJEMPLO 4:

Obtención del preparado vacunal descrito en la presente invención ajustado a diferentes potencias (concentración de proteínas totales por vial).

Con el propósito de demostrar la capacidad de obtener preparados vacunales con diferentes potencias (concentraciones de proteínas totales por vial) se realizó la metodología de purificación como se describe en los a continuación:

Ensayo 1: Al concluir la diafiltración se concentró el conjugado químico purificado hasta una concentración final de proteínas de 2 mg/mL.

Ensayo 2: Al concluir la diafiltración se concentró el conjugado químico purificado hasta una concentración final de proteínas de 5 mg/mL.

Ensayo 3: Al concluir la diafiltración se concentró el conjugado químico purificado hasta una concentración final de proteínas de 12 mg/mL.

En todos los ensayos el volumen total de conjugado químico empleado fue 1500 mL, se opero a una presión transmembrana de 1,5 bar y se realizaron 7 cambios de solución tampón durante la diafiltracion. Para la realización de esta evaluación se establecieron dos criterios de selección: El primero fue alcanzar un porciento homogeneidad del preparado vacunal > 80%. El segundo criterio fue la no presencia de precipitados de proteínas durante la operación de purificación.

Los resultados presentados en la tabla 7 muestran la obtención de preparados vacunales ajustados a diferentes concentraciones de proteínas por mililitro, garantizando elevados niveles de homogeneidad (90.92 %,96.79 % y, 95.50 % de especies conjugadas hrEGF- rP64k) y sin producir precipitación de proteínas en los mismos.

Concentración Proteína	Porciento de homogeneidad del preparado vacunal
2 mg/mL	92 00%
5 mg/mL	96.79 %
12 mg/mL	95.50 %

Tabla 7: Valores correspondientes al porciento de homogeneidad en los preparados vacunales ajustados a diferentes concentraciones finales de proteínas,

EJEMPLO 5:

Remoción de glutaraldehído en el preparado vacunal descrito en la presente inversión.

Para evaluar la remoción del agente conjugante (glutaraldehído) se cuantificó el contenido de glutaraldehído residual en el Preparado Vacunal B y en el Preparado Vacunal A, mediante un método de separación cromatográfica por fase reversa (HPLC-RP) empleando una columna C-8. Este método requirió primeramente, la precipitación de la proteína contenida en las muestras con ácido perclórico y después una reacción con fenilhidracina.

La figura 7 muestra que el contenido residual de esta impureza presente en ambos preparados vacunales fue menor, de 0.2 ug/mL o menor de 0.002 ppm, (concentración límite superior establecida para esta impureza) partiendo de una concentración inicial de 530 mg/mL ó 530 ppm. Aun cuando ambos preparados cumplen con la especificación establecida para esta impureza, la

5 figura 7 ilustra que el preparado vacunal A obtenido de aplicar el método de purificación del conjugado químico por membranas de Ultrafiltración, posee un contenido inferior de glutaraldehído, lo que le aporta gran seguridad para el paciente a dicho preparado vacunal

Breve Descripción de las Figuras.

10 **Figura 1.** Se muestra la superposición del cromatograma de un conjugado homoligomérico rP64k-rP64k y del cromatograma de un conjugado químico EGF-P64k sin purificar. Encerrado en el círculo se muestra la coincidencia de los perfiles entre ambos cromatogramas. El eje X presenta el tiempo al cual eluye cada componente de la muestra y el eje Y representa el valor de intensidad a 216 nm de cada componente de la muestra, como indicador de la concentración de proteína en la

15 misma.

Figura 2. Inmunodetección con un anticuerpo anti EGF conjugado con fosfatasa alcalina posterior a la separación electroforética en SDS- PAGE para preparado vacunal obtenido por ultrafiltración. Línea 1: Marcador de peso molecular, Línea 2 Preparado vacunal

20 **Figura 3.** Se muestra la superposición del cromatograma correspondiente al conjugado homoligomérico hrEGF-hrEGF y del cromatograma de un conjugado químico hrEGF-rP64k sin purificar. Encerrado en el círculo se muestra la coincidencia de especies entre ambos cromatogramas. El eje X presenta el tiempo al cual eluye cada componente de la muestra y el eje Y representa el valor de intensidad a 216 nm de cada componente en la muestra, como

25 indicador de la concentración de proteína en la misma.

Figura 4. Perfil cromatográfico correspondiente al preparado vacunal descrito en la presente invención. El área sombreada se corresponde con las especies conjugadas hrEGF-rP64k. El eje X presenta el tiempo al cual eluye cada fracción y el eje Y representa el valor de intensidad a 216 nm de cada componente en la muestra, como indicador de la concentración de proteína en la

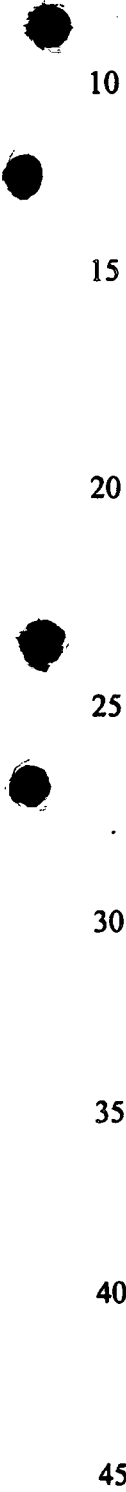
30 misma.

Figura 5. Mapa peptídico de la fracción cromatográfica correspondiente al conjugado hrEGF-rP64k. Se presentan los resultados obtenidos para dos preparado vacunales purificados independientemente a través de una membrana de ultrafiltración. El eje de las X representa el tiempo y el eje de las Y representa las unidades de mili intensidad.

35 **Figura 6:** Títulos de anticuerpos anti EGF en ratones inmunizados con varios inmunógenos: preparado vacunal convencional, preparado vacunal purificado por ultrafiltración y el permeado procedente del método de purificación por ultrafiltración del preparado vacunal El eje X corresponde a las diluciones realizadas al suero obtenido de cada animal y el eje Y representa el

valor de densidad óptica a 405 nm de cada muestra como indicador de la concentración de proteína en la misma.

Figura 7: Perfil cromatográfico por HPLC-RP obtenido durante la cuantificación del contenido de glutaraldehído residual para el preparado vacunal obtenido a partir del método de purificación por empleando las membranas de ultrafiltración 50kDa (Preparado Vacunal A) y para el preparado vacunal obtenido empleando el método de purificación por membrana de diálisis (Preparado Vacunal B).



REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición vacunal cuyo principio activo comprende un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque cada molécula de la proteína rP64K tiene enlazada dos moléculas de hrEGF
2. Una composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque el conjugado proteico hrEGF-rP64k está en una proporción de 12.04 nmoles de proteína rP64k por 24.05 nmoles de hrEGF.
- 10 3. Una composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque es una mezcla homogénea de hrEGF-rP64k libre de especies moleculares como polímeros de hrEGF o hrEGF libre.
4. La composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque la mezcla homogénea de hrEGF-rP64k esta libre de glutaraldehído.
- 15 5. La composición vacunal según reivindicación 1, caracterizada porque adicionalmente contiene un adyuvante apropiado, seleccionado del grupo que comprende hidróxido de aluminio o Montanide.
6. La composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque contiene como adyuvante Montanide.
- 20 7. La composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque contiene como adyuvante hidróxido de aluminio.
8. La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 10 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero mamíferos inmunizados.
- 25 9. La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 10 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero de humanos.
- 30 10. La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 100 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero de humanos.
- 35 11. Un procedimiento para la obtención de forma sanitaria de la composición vacunal de la reivindicación 1 que comprende un procedimiento adecuado de conjugación covalente del EGF, a la proteína transportadora rP64k y la purificación del mismo, empleando una membrana de Ultrafiltración para remover las especies conjugadas biológicamente inactivas y otras impurezas químicas.
- 40 12. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 11, caracterizado porque dicha reacción de conjugación se inicia mezclando la proteína hrEGF concentrada previamente (>6 mg/mL) y la proteína rP64k (≥ 1 mg/mL) en el reactor de conjugación, a dicha mezcla proteica se le añade la solución PBS/MgCl₂ (pH 6.8-7.2) y la solución de conjugación de glutaraldehído 0.5 %, finalmente, la mezcla se mantiene en agitación constante por 2 horas a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura.
13. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 12, caracterizado porque las condiciones de conjugación de las proteínas hrEGF y rP64k

garantizan una relación de conjugación de dos moléculas de hrEGF por cada molécula de rP64k.

- 5
14. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 11, caracterizado porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación covalente se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana que puede estar en el rango entre 50 y 100 kDa.
- 10
15. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 14, caracterizada porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación química se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de 50 kDa.
- 15
16. Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 14, caracterizado porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación química se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de 100 kDa.
- 20
17. La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque esta purificada por el método de la reivindicación 15.
- 25
18. La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque esta purificada por el método de la reivindicación 16.
- 30
19. La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque la concentración final de proteína total del preparado vacunal se ajusta en un rango entre 1 - 12 mg/mL.
- 35
20. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 17 para la fabricación de un reactivo útil para desencadenar una respuesta inmune contra el EGF humano.
- 40
21. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 18 para la fabricación de un reactivo útil para desencadenar una respuesta inmune contra el EGF humano.
22. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 17 para la fabricación de un reactivo útil en el tratamiento de tumores de origen epitelial.
23. Uso de la composición vacunal de la reivindicación 18 para la fabricación de un reactivo útil en el tratamiento de tumores de origen epitelial.

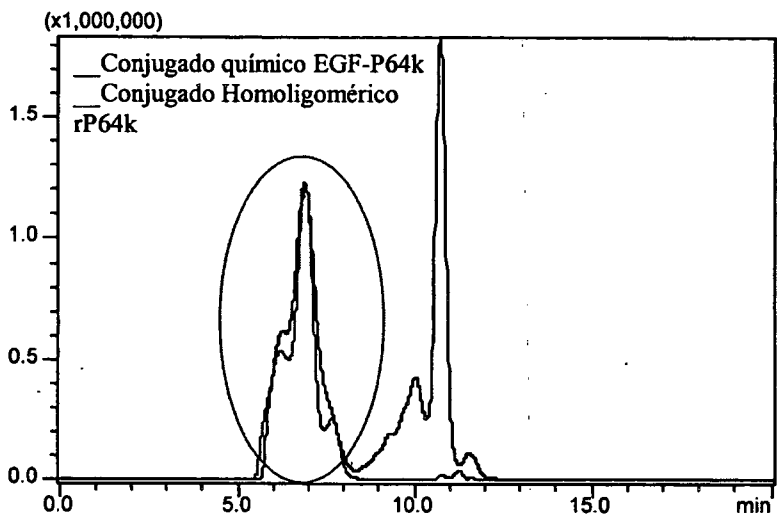


Figura 1

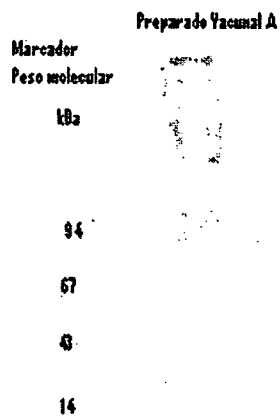


Figura 2

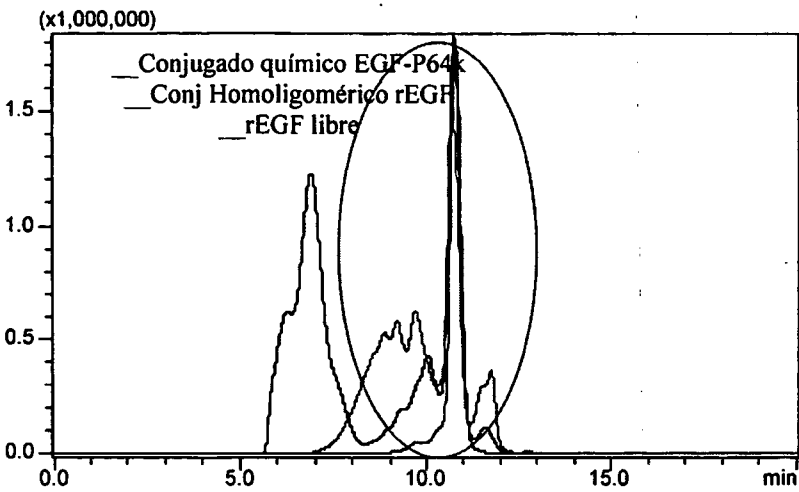


Figura 3

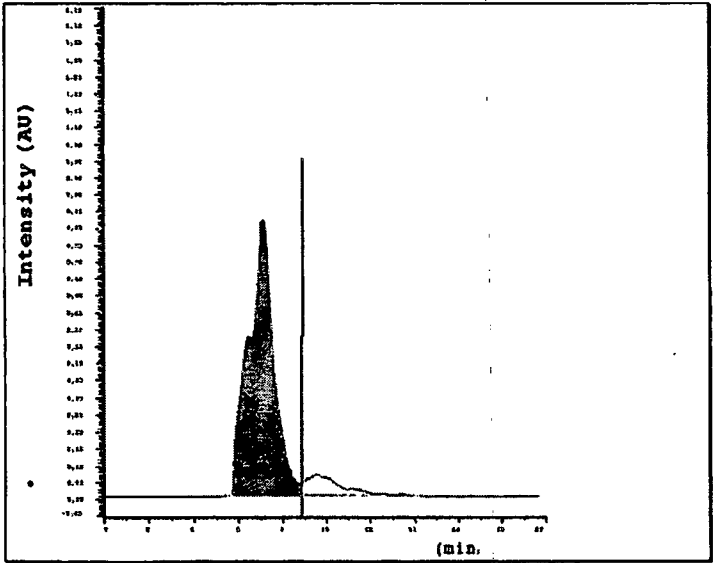


Figura 4.

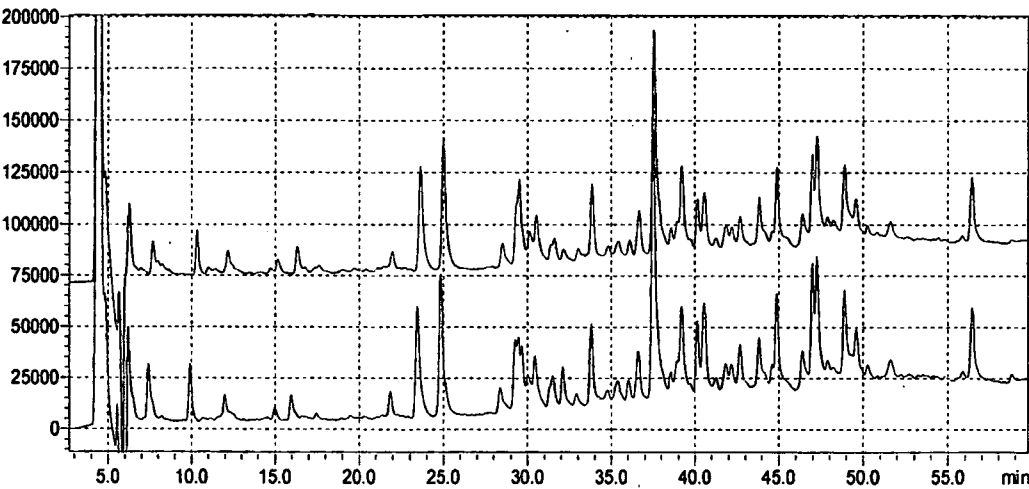


Figura 5

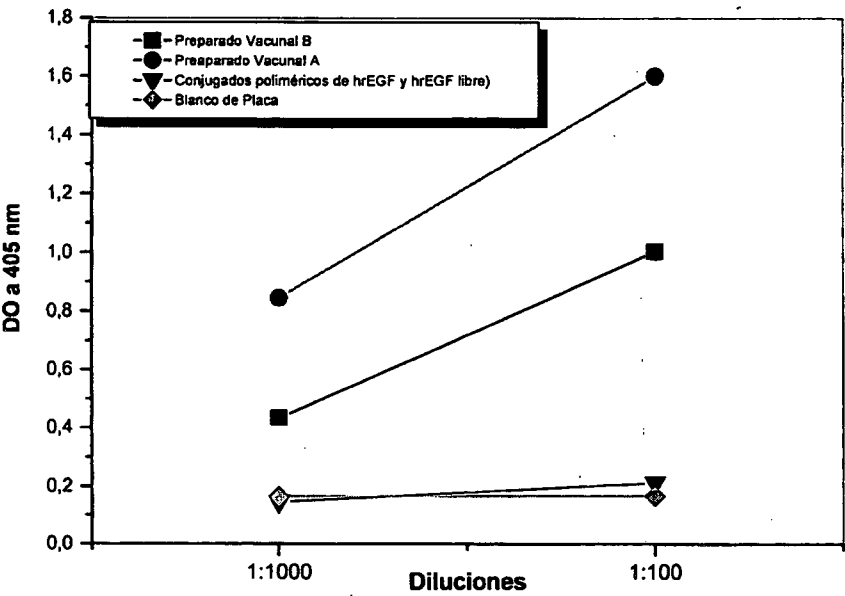


Figura 6

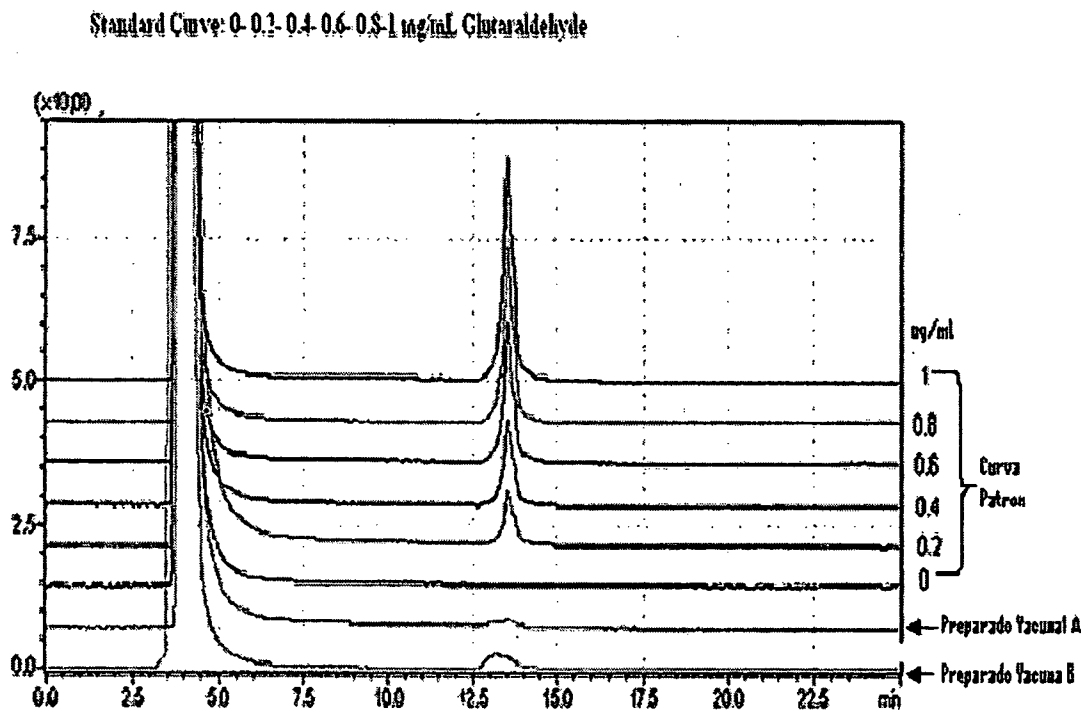


Figura 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2008/000005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

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 practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONZÁLEZ, G. et al., "Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials.", HUM. VACCIN., 2007 Jan-Feb, Vol. 3, No. 1, pages 8-13. Methods, Results, Tables 1 and 2, figure 1.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial.", ANN. ONCOL., 1998, Vol. 9, No. 4, pages 431-435. Methods.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy.", ANN. ONCOL., 2003, Vol. 14, No. 3, pages 461-466. Methods.	1-23

☒ 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 documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 October 2008 (06.10.2008)

Date of mailing of the international search report

(09/10/2008)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J.L. Vizán Arroyo

Telephone No. +34 91 349 85 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU 2008/000005

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMOS, T.C. et al., "Treatment of NSCLC patients with an EGF-based cancer vaccine: report of a Phase I trial.", CANCER. BIOL. THER., 2006, Vol. 5, No. 2, pages 145-149. Material and Methods.	1-23
A	WO 0245747 A1 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR CUBA, Y OTROS) 13.06.2002, Page 6, lines 26-32; Examples 1 and 2.	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ CU 2008/000005

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0245747 A	13.06.2002	UY 27058 A	22.03.2002
		CA 2431199 A	13.06.2002
		AU 2152102 A	18.06.2002
		US 2002160014 A	31.10.2002
		AR 031641 A	24.09.2003
		EP 1350521 A	08.10.2003
		EP 20010999388	06.12.2001
		BR 0116010 A	06.01.2004
		ZA 200304415 A	07.07.2004
		MXPA 03005030 A	10.09.2004
		NZ 526284 A	26.11.2004
		CN 1592636 A	09.03.2005
		CN 1326566 C	18.07.2007
		JP 2005519023 T	30.06.2005
		US 2006188497 A	24.08.2006
		AU 2002221521 B	04.01.2007
		HK 1073244 A	14.03.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ CU 2008/000005

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ CU 2008/000005

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	GONZÁLEZ, G. et al., "Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials.", HUM. VACCIN., 2007 Jan-Feb, Vol. 3, No. 1, páginas 8-13. Métodos, Resultados, Tablas 1 y 2, Figura 1.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial.", ANN. ONCOL., 1998, Vol. 9, No. 4, páginas 431-435. Métodos.	1-23
A	GONZÁLEZ, G. et al., "Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy.", ANN. ONCOL., 2003, Vol. 14, No. 3, páginas 461-466. Métodos.	1-23

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

06 Octubre 2008 (06.10.2008)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 de Octubre de 2008 (09/10/2008)

Funcionario autorizado

J.L. Vizán Arroyo

N° de teléfono +34 91 349 85 73

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 2008/000005

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	RAMOS, T.C. et al., "Treatment of NSCLC patients with an EGF-based cancer vaccine: report of a Phase I trial.", CANCER. BIOL. THER., 2006, Vol. 5, No. 2, páginas 145-149. Materiales y Métodos.	1-23
A	WO 0245747 A1 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR CUBA, Y OTROS) 13.06.2002, Página 6, líneas 26-32; Ejemplos 1 y 2.	1-23

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU 2008/000005

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 0245747 A	13.06.2002	UY 27058 A	22.03.2002
		CA 2431199 A	13.06.2002
		AU 2152102 A	18.06.2002
		US 2002160014 A	31.10.2002
		AR 031641 A	24.09.2003
		EP 1350521 A	08.10.2003
		EP 20010999388	06.12.2001
		BR 0116010 A	06.01.2004
		ZA 200304415 A	07.07.2004
		MXPA 03005030 A	10.09.2004
		NZ 526284 A	26.11.2004
		CN 1592636 A	09.03.2005
		CN 1326566 C	18.07.2007
		JP 2005519023 T	30.06.2005
		US 2006188497 A	24.08.2006
		AU 2002221521 B	04.01.2007
		HK 1073244 A	14.03.2008

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N° PCT/ CU 2008/000005

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

(72) Inventor(es) **GRYSELL MARIA RODRIGUEZ MARTINEZ; LISEL VIÑA RODRIGUEZ; LOANY CALVO GONZALEZ; ARIADNA CUEVAS FIALLO; ERNESTO CHICO VELIZ; AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA; TANIA CROMBET RAMOS; AIRAMA ALBISA NOVO; GISELA MARIA GONZALEZ MARINELLO**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

32)

Fecha

(33)

País

154-2007

29/06/2007

CU

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **08/01/2009**

Fecha de presentación de la solicitud: **26/06/2008**

N° publicación: **WO 2009/003425 A1**

No. de solicitud **PCT/CU2008/000005**

(54) Titulo: **OBTENCION DE UN PREPARADO VACUNAL HOMOGNEO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER**

 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: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad 32) Fecha (33) País 154-2007 29/06/2007 CU		(51) Int. Cl.: (71) Solicitante(s) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (72) Inventor(es) GRYSELL MARIA RODRIGUEZ MARTINEZ LISEL VIÑA RODRIGUEZ LOANY CALVO GONZALEZ Y OTROS (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 26/06/2008 N° de solicitud PCT/CU2008/000005		(87) Publicación internacional Fecha: 08/01/2009 N° publicación: WO 2009/003425 A1	
(54) Título: OBTENCION DE UN PREPARADO VACUNAL HOMOGENEO PARA EL TRATAMIENTO DE CANCER			

Reivindicación(es):

- Una composición vacunal cuyo principio activo comprende un conjugado proteico hrEGFrP64k, caracterizada porque cada molécula de la proteína rP64K tiene enlazada dos moléculas de hrEGF
- Una composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque el conjugado proteico hrEGF-rP64k está en una proporción de 12.04 nmoles de proteína rP64k por 24.05 nmoles de hrEGF.
- Una composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque es una mezcla homogénea de hrEGF-rP64k libre de especies moleculares como polímeros de hrEGF o hrEGF libre.
- La composición vacunal según reivindicación 1 caracterizada porque la mezcla homogénea de hrEGF-rP64k esta libre de glutaraldehído.
- La composición vacunal según reivindicación 1, caracterizada porque adicionalmente contiene un adyuvante apropiado, seleccionado del grupo que comprende hidróxido de aluminio o Montanide,
- La composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque contiene como adyuvante Montanide.
- La composición vacunal según reivindicación 5, caracterizada porque contiene como adyuvante hidróxido de aluminio.
- La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 10 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero mamíferos inmunizados.
- La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 10 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero de humanos.
- La composición vacunal según reivindicaciones 1 caracterizada porque induce un incremento de al menos 100 veces el título de anticuerpos anti-EGF en el suero de humanos.
- Un procedimiento para la obtención de forma sanitaria de la composición vacunal de la reivindicación 1 que comprende un procedimiento adecuado de conjugación covalente del EGF, a la proteína transportadora rP64k y la purificación del mismo, empleando una membrana de Ultrafiltración para remover las especies conjugadas biológicamente inactivas y otras impurezas químicas.

- Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 11, caracterizado porque dicha reacción de conjugación se inicia mezclando la proteína hrEGF concentrada previamente (>6 mg/mL) y la proteína rP64k (> 1 mg/mL) en el reactor de conjugación, a dicha mezcla proteica se le añade la solución PBS/MgCl₂ (pH 6.8-7.2) y la solución de conjugación de glutaraldehído 0.5 %, finalmente, la mezcla se mantiene en agitación constante por 2 horas a 22°C de temperatura.
- Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 12, caracterizado porque las condiciones de conjugación de las proteínas hrEGF y rP64k garantizan una relación de conjugación de dos moléculas de hrEGF por cada molécula, de rP64k.
- Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 11, caracterizado porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación covalente se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana que puede estar en el rango entre 50 y 100 kDa.
- Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 14, caracterizada porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación química se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de 50 kDa.
- Un procedimiento para la obtención de la composición vacunal según la reivindicación 14, caracterizado porque el paso de purificación del producto de la reacción de conjugación química se realiza por el método de ultrafiltración/diafiltración usando una membrana de 100 kDa.
- La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque esta purificada por el método de la reivindicación 15.
- La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque esta purificada por el método de la reivindicación 16.
- La composición vacunal cuyo principio activo es un conjugado proteico hrEGF-rP64k, caracterizada porque la - concentración final de proteína total del preparado vacunal se ajusta en un rango entre 1 - 12 mg/mL.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 -- 95,250
FECHA : DICIEMBRE 17 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-145155- -00000-0000

Fecha: 2009-12-18 14:24:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105803880	17/12/2009	3,355,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SDI. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 95,252
FECHA : DICIEMBRE 17 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-145155- -00000-0000

Fecha: 2009-12-18 14:24:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105003080	17/12/2009	3.355.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
0	50005-01-01	SOLICITUD	
		REFUNDICACION UNITARIA ADICIONAL	200.000.00
		TOTAL :	200.000.00

SON: DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



No. 09-145155- -00000-0000

Fecha: 2009-12-18 14:24:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		LISTA DE CHEQUEO ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES	
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		
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		
☒	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,
2020

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

REFERENCIA	Radicación No.	9 145155
	Solicitud internacional	PCT/CU2008/00005
	Fecha inicio fase nacional	29/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2146

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.

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

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 145155


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 19. FEB. 2010
adpall