



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

FASE NACIONAL - PCT

03-48135

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "COMPOSICION VACUNAL QUE COMPRENDE FACTOR
DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE ALFA (TGF-ALPHA)"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00 ; C12 P21/02

71. SOLICITANTE CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

DOMICILIO Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, C. Habana 12100, CUBA

74. APODERADO DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTÁ, D. C.

QF

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

SOLICITUD DE:

①

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I

☒

Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **CENTRO DE INMUNOLOGIA
MOLECULAR**

Dirección: Calle 216 Esq. 16, Atabey, Playa,
C. Habana 12100, CUBA

Nacionalidad o Domicilio: CUBA

Lugar de Constitución: CUBA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**

Dirección: **CARRERA 9 No. 83-09**

Teléfono: **810 74 80** Fax: **810 07 06**

E-mail: **acastell@impsat.net.co**

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número **39'779.854** TPA **70.819**

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (VER ANEXO No. 1)

Dirección: (VER ANEXO No. 1)

Nacionalidad o Domicilio **Cubanos**

⑤

PCT (66)

Solicitud Internacional No.

PCT/GU01/00011

Fecha

06/12/2001

Publicación Internacional No.

WO 02/45738 A2

Fecha

13/06/2002

⑥

Título (64)

**"COMPOSICION VACUNAL QUE COMPRENDE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFOR-
MANTE ALFA (TGF-ALPHA)"**

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/00

C12P 21/02 ; C12N 1/12 ; A61K 38/18.

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI

☒

NO

☐

CU

12/06/00

288/2000

⑨

Comprobante de pago No.

03-37.812

Fecha

Mayo 29, 2003

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

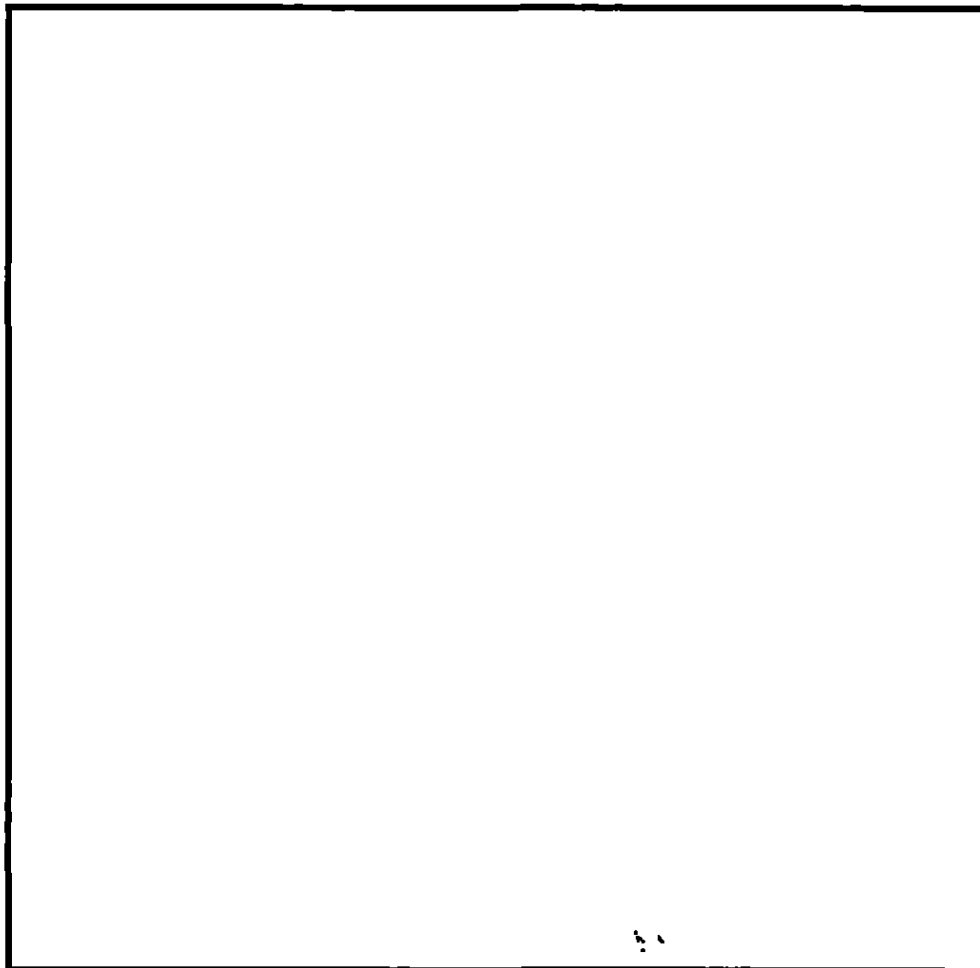
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite 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

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

C.C. No. 38.779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 8 No. 83-08
Apartado 8348
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO No. 1

INVENTORES

NOMBRE

DOMICILIO

1.- AILLETTE MULET SIERRA

**Calle Vento esq. 3ra, Edificio No. 7916, Apto. 13,
Provincia Ciudad Habana, CUBA**

2. ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ

**Calle Juan Delgado No. 567 entre Acosta y
O'farrill, 10 de Octubre, Provincia Ciudad Habana,
CUBA**

3. GISELA MARIA GONZALEZ M.

**Calle 82b entre 5ta A y 7ma B No. 516 bajos,
Playa, Provincia Ciudad Habana, CUBA**

4. ANABEL ALVAREZ ACOSTA

**Calle 186 No. 3115 Apto. 2 entre 31 y 33, Playa,
Provincia Ciudad Habana, CUBA**

5. TAMARA MENENDEZ MEDINA

**Calle 30 No. 3307 entre 33 y 35, Playa,
Provincia Ciudad Habana, CUBA**

6. GERARDO GUILLEN NIETO

**Calle Linea entre N y O, piso 4, Plaza de la
Revolución, Provincia Ciudad Habana, CUBA**

7. BELINDA SANCHEZ RAMIREZ

**Calle Lealtad No. 415 Apto. 22 entre San José y
San Rafael, Centro Habana, Provincia Ciudad
Habana, CUBA**

Kaditacion : 00000000 00000000
Fecha (anio): 2003-05-06 12:44:49
Tramite : VIA PLI-PALENI A/9 FASE PALENI 411 INDUSTRIAL
NIT : Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 37,912
FECHA : MAYO 29 DE 2003

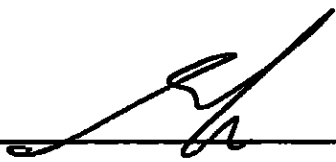
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
TERESA ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9018695	29/05/2003	10,321,700.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 93-09
Apartado 6349
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

Ref.: PODER conferido por la sociedad 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 la sociedad CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, con domicilio en Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, C. Habana 12100, CUBA, debidamente legalizado por el Ministerio de Relaciones Exteriores bajo el No. 102503 el día 23 de Enero de 2001, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente de Invención PCT en Fase Nacional para: "COMBINACIÓN VACUNAL QUE COMPRENDE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE ALFA (TGF-ALPHA)".

Del Señor Jefe,

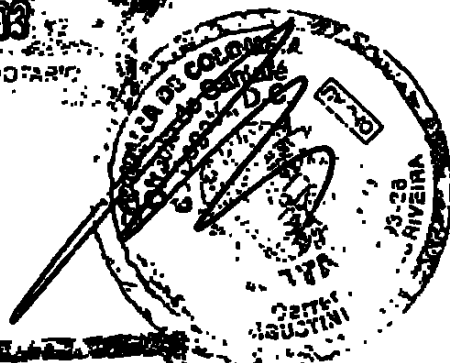
Acepto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. 39.773.330 de Usaquén
T.P.A. No. 58.236 del C.S.J.
Carrera 9 No. 93-09 - Bogotá, D.C.
Teléfonos: 6107420 - 6107480


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén
T.P.A. No. 70.819 del C.S.J.
Carrera 9 No. 93-09 - Bogotá, D.C.
Teléfonos: 6107420 - 6107480

Bogotá, D.C.
XCAMCA/4874FNPCT

AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
 (Art. 84 C.F.C. mod. Decr. 2292 de 1989, art. 1 mod. 38)
 Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
 de esta ciudad compareció personalmente:
Ximene Castañeda Mora
 identificada con C.C. 39293849
 edad 35 años y tarjeta profesio-
 nal 59056 del Consejo
 de la Abogacía, con documento di-
Superintendente
 Firma del declarante
29 MAYO 2003
 En Bogotá D.C. a
 AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
 (Art. 84 C.F.C. mod. Decr. 2292 de 1989, art. 1 mod. 38)
 Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
 de esta ciudad compareció personalmente:
Mariposa Ciller
 identificada con C.C. 3977963
 edad 40 años y tarjeta profesio-
 nal 70819 del Consejo
 de la Abogacía, con documento di-
Superintendente
 Firma del declarante
29 MAYO 2003
 En Bogotá D.C. a
 AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



PODER

El (los) suscrito (s) Agustín Lage Dávila,
Director del CENTRO DE INMUNOLOGIA
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:

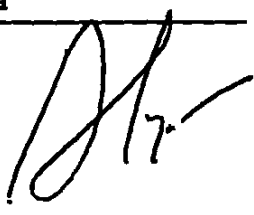
a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industria-
les; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas
y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñas
comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y
cambio de nombre o domicilio, cancelación 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
promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y
gestiones arriba determinados sustituir este mandato, transigir,
desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nom-
brar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado 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 which
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, extension, 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 in fact
in or out of Court.

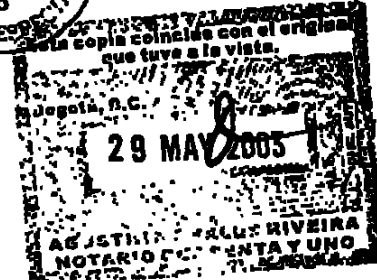
Given and signed this _____

in _____

By _____

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

Lic. Estrella Díaz Domínguez
Notario



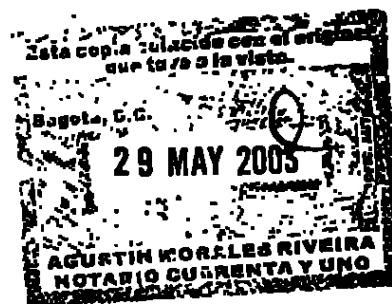
Yo, LICENCIADA ESTRELLA DIAZ BOSMENIER. Notaria de la Notaria Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, con sede en GALE Y ASOCIADOS S.A., DOY FE que la firma que antecede es la del señor AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA, ciudadano cubano, con identidad permanente número 49032207966, 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.

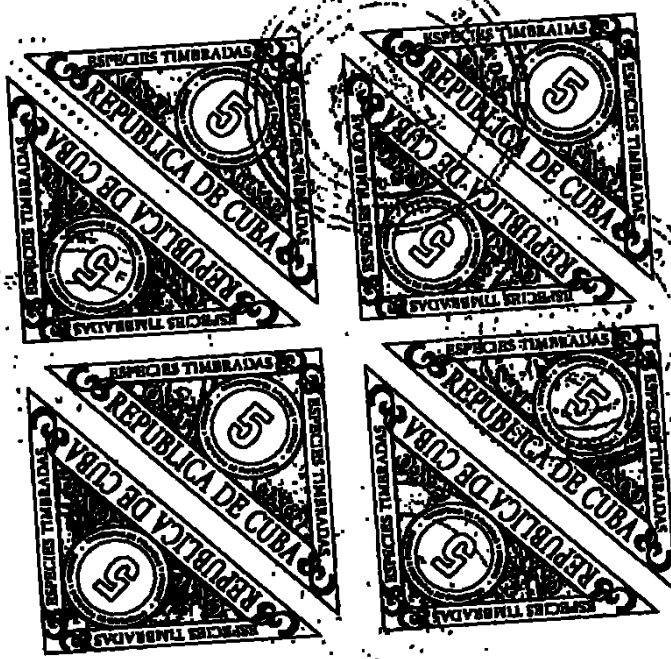


[Handwritten signature]

Lic. Estrella Díaz Bosmenier
Notario



GENERAL DE CUBA



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION DE ASUNTOS CONSULARES Y DE
CUBANOS RESIDENTES EN EL EXTERIOR.

José R. Cabañas Rodríguez, /o Manuel Capas
Bata, /o Mercedes de Armas Garza, /o José
Fernández Ponce, /o María Piliña Fernández
Villar, /o Eduardo Velasco García.
Funcionarios autorizados para emitir Auto-
rizationes de viaje y documentos expedidos
para salir al extranjero.

CONFIRMACION DEL
DOCUMENTO
AUTORIZACION QUE
EXISTE EN ESTE
LIBRO
FECHA CON LA
CUAL

18 DIC. 2000

✓

29 MAR 2003
AGUSTIN TORRES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO



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, visto 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.



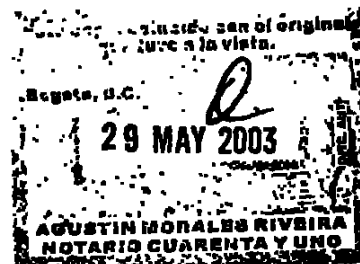
Vilma Rebeca Gálvez López

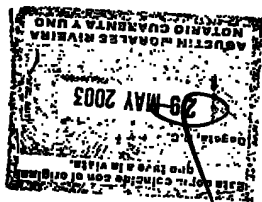
Vilma Rebeca Gálvez López
Auxiliar Administrativo 5 PA
Encargada de Funciones Consulares

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

US\$ 7.00 (siete dólares)
US\$ 100.00 (cien dólares)
US\$ 107.00 (cientosiete dólares)





MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

102503
R. Salas
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JAN 23 A 2 07

[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE ALFA.

Sector Técnico

- 5 La presente invención está relacionada con el campo de la inmunología y la medicina humana, en particular con un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración contra el TGF alfa ($TGF\alpha$) autólogo, la que puede ser utilizada para el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas y otras enfermedades relacionadas con el $TGF\alpha$.

10 Técnica Anterior

- El Factor de Crecimiento Transformante alfa, $TGF\alpha$ siglas en Inglés, es un polipéptido de 50 aminoácidos, originalmente aislado del medio de cultivo de células transformadas por retrovirus. En un inicio se definió como una molécula capaz de competir con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, siglas en Inglés) por la unión al EGF-R. Sin embargo, anticuerpos anti-EGF no fueron capaces de reconocer al $TGF\alpha$ (Todaro et al. (1976), Nature 264, 26-31), por lo que desde entonces se conoce que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

- El $TGF\alpha$ forma parte de la familia del EGF, que está constituida por proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Los otros miembros de esta familia son: EGF, anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, eplregulina. 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).

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

- El EGF-R es una glicoproteína de 170 kD aproximadamente, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular de este receptor está 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.).

El TGF α es sintetizado en forma de un precursor de membrana (pro-TGF α), de 160 aminoácidos y mediante proteólisis enzimática se libera una proteína soluble de 150 aminoácidos aproximadamente, el TGF α maduro.

El TGF α humano (hTGF α) muestra un 43% de identidad en la secuencia aminoacídica con el EGF humano (hEGF) y un 93% con el TGF α de ratón ó rata. Además sus efectos biológicos no son especie específicos.

El trabajo de muchos laboratorios ha documentado la habilidad del TGF α de regular la proliferación, migración y diferenciación de células en cultivo (Carpenter y Wahl, (1990), Springer-Verlag, Berlin, pp.69-171.)

10 El TGF α es el ligando del EGF-R más expresado. Se expresa en tejidos normales durante la embriogénesis y en tejidos adultos normales y tumorales. Sin embargo, no se observan defectos patológicos mayores en ratones TGF α "Knock-out" y estos ratones son viables y fértiles (Bruce Mann y cols.(1993), Cell, 73, 249-261.).

En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrinos y autocrinos de activación del EGF-R, está dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

En tumores de origen epitelial se han detectado altos niveles de EGF-R y en muchos casos, la sobreexpresión de este receptor constituye un indicador de mal pronóstico.

20 La inducción de TGF α es un evento frecuente en la transformación neoplásica. De hecho, se han realizado numerosos estudios que muestran la sobreexpresión de esta molécula en tumores epiteliales de distintas localizaciones, que incluyen, mama, pulmón, cerebro, hígado, próstata, vejiga, tracto gastrointestinal, colon, recto, tejido reproductivo (ovario) y endocrino, entre otros.

25 Aunque el mecanismo de inducción de tumorigenicidad por el TGF α es aún desconocido, sí existen algunos reportes que correlacionan la sobreexpresión de este factor de crecimiento con el grado del tumor, la supervivencia de pacientes y otros marcadores tumorales. Algunos investigadores han demostrado su relación con otros oncogenes como c-myc en hepatocarcinomas. Además constituye un blanco del gen supresor de tumores (VHL) (Sumarizado en Lee y cols (1996), Growth Factors and Cytokines in Health and Disease, Volume 1B, 277-318.).

Aunque el TGF α y el EGF se unen al mismo receptor con afinidades comparables, generalmente el TGF α es más potente que el EGF, y en algunos contextos, sus efectos se han descrito como más fuertes y/o más prolongados (Barrandon and Green (1987), Cell 50, 1131-1137). Se ha reportado que en el caso de la

5 Internalización del complejo TGF α /EGF-R, tanto el TGF α como el EGF-R son preferiblemente reciclados a la superficie mientras cuando el complejo EGF/EGF-R es internalizado en el mismo tipo celular, los dos componentes son eficientemente degradados (Ebner y Derynck (1991), Cell Regul.2,599-612), lo que sugiere que las

10 diferencias en la actividad biológica puede estar dada por diferencias en los mecanismos que ocurren en el interior celular. Por otra parte el TGF α es un factor angiogénico más potente que el EGF (Schreiber y cols.(1986), Science 232, 1250-1253.)

En cuanto a la expresión en tumores, aun cuando hay evidencias de la presencia del precursor de EGF en membranas de algunos tumores epiteliales, el TGF α es

15 expresado por una mayor cantidad de tumores del mismo origen, y se plantea que su acción, a diferencia del EGF, es principalmente mediante la formación de un lazo autocrino con el EGF-R. Por otra parte, resultados obtenidos indican que en biopsias de tumores epiteliales de algunos tipos, se observa la presencia de TGF α y no EGF (carcinoma ductal de mama, laringe), mientras otros tumores presentan más EGF

20 que TGF α (cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Estos resultados sugieren que los factores de crecimiento pueden tener impactos diferentes en la biología tumoral de la célula neoplásica blanco.

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

25 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 autólogo (Patente US 5,984,018). De hecho, se han obtenido evidencias tanto preclínicas como clínicas acerca de la inmunogenicidad y la baja toxicidad provocada por la vacunación con hEGF unido

30 a una proteína transportadora (González y cols.(1996), Vaccine Research 5(4), 233-243.)

Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con hEGF en adyuvante, incrementa la sobrevivencia de ratones transplantados con el tumor ascítico de Erlich (TAE) (González y cols. (1996).Vaccine Research 5(4), 233-243.).

- Se realizó una construcción genética de una proteína de fusión que contiene la
- 5 secuencia del hEGF insertada entre el aminoácido 45/46 de la P64K. Esta proteína se usó como inmunógeno en ratones, provocando una respuesta inmune humoral específica contra el hEGF con impacto en el aumento de sobrevivencia de animales transplantados con células de TAE. (González y cols (1997), Vaccine Research 6(2), 91-100.)
- 10 En dos ensayos clínicos pilotos realizados con pacientes con NSCLC, se observó una tendencia en el aumento de la sobrevivencia de los pacientes vacunados cuando se comparan contra un control histórico. En los pacientes con alta respuesta sérica contra el hEGF se observó un marcado incremento en la sobrevivencia (González y cols.(1998), Annals of Oncology 9, 1-5.).
- 15 En sentido general la vacunación con EGF no genera una respuesta de anticuerpos específicos contra el TGF α . Sin embargo existen evidencias que la vacunación con un preparado inmunogénico que contiene TGF α en el modelo murino genera un nivel de anticuerpos anti-EGF solamente en algunos ratones. Dicha respuesta en algunos casos es capaz de bloquear la unión EGF a su receptor en un ensayo *in*
- 20 *vitro*, sin embargo los niveles de anticuerpos anti-EGF obtenidos no son suficientes para generar una respuesta de inmunocastración del EGF con impacto en la respuesta antitumoral.

- Debido a que la acción de cada uno de estos dos factores de crecimiento es diferente en cada tumor y/o entre el tumor primario y sus metástasis, una vacuna
- 25 que combine los dos ligandos principales del EGF-R, TGF α y EGF, tendría un efecto antitumoral superior en los tumores de origen epitelial, en sentido general.

- Hasta el momento no existe ninguna terapia conocida que involucre la utilización de un preparado vacunal que contenga TGF α humano (hTGF α) o cualquier derivado del mismo, o una combinación de éste con otro ligando del EGF-R, EGF, en la
- 30 inmunoterapia activa de cáncer.

Divulgación de la invención

La presente invención provee una composición vacunal que contiene TGF α humano o cualquier derivado del mismo de cualquier origen, unido genéticamente (proteína

de fusión recombinante) ó acoplado por métodos químicos a una proteína transportadora, capaz de inhibir el crecimiento de tumores de origen epitelial, a través de un efecto de inmunocastración, sin efectos colaterales de importancia. También provee de una composición vacunal que contiene una combinación de

5 hTGF α o cualquier derivado con hEGF o cualquier derivado unidos a una proteína transportadora.

La composición vacunal puede ser utilizada en el tratamiento de tumores de origen epitelial dependientes de TGF α ó TGF α /EGF, o en cualquier otra enfermedad asociada con el TGF α tales como la psoriasis (Kapp, A (1993) J Dermatol Sci ,

10 Jun;5(3):133-42).

En la especificación de TGF α , se incluye cualquier fragmento y/o derivado del TGF α que tenga propiedades inmunológicas y/o efectos semejantes a la molécula original. Los derivados incluyen, pero no se excluyen otros, sustituciones originales de aminoácidos, cambio de aminoácidos sitio específico que incrementen la estabilidad

15 y/o la actividad, modificaciones químicas, entre otras.

Más específicamente la invención consiste en un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración contra el TGF α autólogo, que pueda ser utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas y otras enfermedades relacionadas con el TGF α .

20 Por otra parte dicha invención incluye la utilización de un preparado vacunal constituido por una combinación de TGF α y EGF, para el tratamiento de neoplasias malignas que dependan de estos dos factores de crecimiento en el curso de su patogénesis.

1- Preparaciones Inmunogénicas:

25 En la presente invención se utiliza un preparado vacunal que incluye hTGF α unido a una proteína transportadora por métodos de Ingeniería genética (proteína de fusión recombinante) o por métodos químicos de conjugación. El hTGF α utilizado en cualquiera de las preparaciones inmunogénicas se obtiene tanto de fuente natural, recombinante ó sintética. Diferentes proteínas pueden ser utilizada como

30 transportadoras. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden utilizar: Toxide Tetánico, KLH, la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, entre otras. Las

cantidades óptimas de hTGF α en la formulación vacunal oscilan entre 5 μ g y 1000 μ g por dosis.

Por otra parte se utiliza un preparado vacunal que contiene una combinación del hTGF α con el hEGF (Oficina de Registro Nacional de Medicamentos, HEBERMIN

5 No 1286).

En la especificación de TGF α ó EGF, se incluye cualquier fragmento y/o derivado del TGF α ó EGF que tenga propiedades inmunológicas y/o efectos semejantes a la molécula original. Los derivados incluyen, pero no se excluyen otros, sustituciones

10 originales de aminoácidos, cambio de aminoácidos sitio específico que incrementen la estabilidad y/o la actividad, modificaciones químicas, entre otras.

A) Obtención de la proteína de fusión TGF α -Proteína transportadora por métodos de ingeniería genética:

El gen que codifica para el hTGF α (500 pb) se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores espe

15 resultante es digerido y ligado en un sitio de unión específico a un vector de expresión en el cual se encuentra clonado el gen que codifica para la proteína transportadora, de manera que la proteína resultante incluye una copia o mas de las

dos moléculas. Se puede utilizar cualquier vector de expresión tanto de células superiores (mamíferos) como inferiores (bacterias o levaduras). El vector también

20 puede incluir seis histidinas en el extremo N-Terminal de la proteína transportadora. El plásmido resultante es verificado por análisis de restricción en geles de agarosa,

análisis de la secuencia de ADN usando la enzima secuencasa 2.0 (Amersham-USB), y finalmente, análisis de la producción de la proteína de fusión en cualquier

25 capa de expresión de *Eschericia coli*, mediante la técnica de "Western Blotting", usando un anticuerpo monoclonal específico contra hTGF α (R&D System). Para

obtener la proteína se rompen las paredes bacterianas usando un método de ruptura fuerte y luego se purifica la proteína por una combinación de métodos de precipitación diferencial con sulfato de amonio y métodos cromatográficos.

Finalmente, la proteína es filtrada en condiciones estériles y conservada a -20°C o

30 liofilizada y conservada a 4°C hasta su uso posterior.

B) Obtención de conjugados químicos que contiene hTGF α :

Se obtienen diferentes preparaciones que contienen hTGF α conjugado con diferentes proteínas transportadoras (como P64K). En principio se puede utilizar cualquier método de acoplamiento químico. Como método químico preferencial se utiliza el método que utiliza el agente EMCS descrito en la patente norteamericana,

5 U. S. No. 4,302,386; Lee y cols., 1981.

Alternativamente, se puede utilizar el método de conjugación con glutaraldehído. Con este fin, se mezclan estas dos ó tres moléculas a una concentración de 1 mg/mL en la solución final con glutaraldehído al 0.05% (en la solución total). La mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente, y se dializa contra una solución

10 de PBS 1X/MgCl₂ 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realiza una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtra en condiciones estériles y se almacena a 4°C hasta su uso.

C) Obtención de una vacuna que combine el hTGF α y el hEGF.

La obtención de una vacuna que combine los dos principales ligandos del EGF-R

15 puede realizarse de diferentes maneras:

- 1- Unión de las dos vacunas que contienen el hTGF α o el hEGF por separado unido a una proteína transportadora en una relación 1:1 en el momento de la inyección. Con este fin se pueden utilizar las proteínas de fusión o los conjugados químicos de ambas moléculas. Las cantidades óptimas de hTGF α y hEGF en la
- 20 formulación vacunal oscilan entre 5 μ g y 1000 μ g por dosis.
- 2- Obtención de una construcción genética similar a la descrita en la sección A que contenga los dos factores de crecimiento, hTGF α y hEGF o una combinación de cualquiera de sus derivados.
- 3- Obtención de un conjugado químico que contenga el hTGF α , hEGF o una
- 25 combinación de cualquiera de sus derivados y una proteína transportadora utilizando la metodología descrita en la sección B.

D) Obtención de la preparación inmunogénica:

Para potenciar el efecto inmunogénico deseado de las composiciones vacunales, es conveniente usar un adyuvante adecuado y seleccionar un modo de administración

30 en el cual el preparado vacunal exhiba una alta inmunogenicidad.

Las composiciones vacunales referidas en esta invención son adyuvadas de dos maneras específicas

- 1) En $\text{Al}(\text{OH})_3$ formando soluciones acuosas del preparado vacunal adsorbido a este compuesto. De 5 μg a 1000 μg de $\text{TGF}\alpha$ por dosis de inmunógeno se unen a un rango entre 2 y 5 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y se deja en agitación por espacio de 1 hora. La solución final se conserva a 4°C hasta su uso posterior.
- 5 2) En adyuvante Incompleto de Freund que permiten la formación de emulsiones acuosas/oleosas u oleosas/acuosas. Las cantidades de Inmunógeno y adyuvante en la composición final se encuentran en un rango volumen / volumen de 40/60 a 60/40. Los volúmenes dependen de la emulsión final deseada. El adyuvante se añade antes de la inmunización y se agita por un periodo de 10 a 30 minutos. a
- 10 temperatura ambiente.

Los volúmenes finales de cada inmunógeno cubren el rango adecuado para la ruta correspondiente.

- En el caso de las vacunas que se conjugan en el momento de la inyección descritas en la sección C 1, las dos vacunas adyuvadas como se ha descrito anteriormente se
- 15 pueden tanto unir por agitación e inyectar o inyectar por separado.

La administración de las composiciones vacunales se pueden realizar por diversas rutas: vía intramuscular, vía subcutánea, vía intranasal y vía intradérmica.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN.

- Ejemplo1: Obtención del segmento de ADN que codifica para $\text{TGF}\alpha$ maduro por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .**
- 20

A partir de un vector comercial pBluescript KS⁺ que tiene clonado en un sitio ECOR V la cadena complementaria de ADN (ADNc) del hTGF α (PSK-TGF α) (CIGB, Cuba) , se amplificó la secuencia de 150 aminoácidos correspondiente al TGF α maduro (Fig.1) usando los cebadores específicos para el hTGF α maduro.

- 25 **N-Terminal: 5'- GCTCTAGAAGTGGTGTCCCATTTTAATGAC-3' (Subrayado , secuencia de corte de la enzima de restricción XbaI)**

C-Terminal: 5'-CGGAATTCGCCAGGAGGTCCGCATGCTCAC-3' (Subrayado, secuencia de corte de la enzima de restricción EcoRI)

- Brevemente, Se utilizaron 200 ng del PSK TGF α en 75 μL de una mezcla que
- 30 contiene: 500ng de cada uno de los cebadores específicos, una mezcla de nucleótidos trifosfatos a una concentración de 200 μM cada uno, MgCl_2 a 25 mM y 100 Unidades de la enzima Taq Polimerasa (Promega) en solución tampón

suministrada por Promega. Se realizaron 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), hibridación (1 minuto a 60°C), y extensión (30 segundos a 72°C). Al primer ciclo se antecedió un tiempo de desnaturalización de 4 minutos, y después del último ciclo, se llevo a cabo una extensión de 2 minutos.

- 5 El producto del PCR se separó por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y el segmento génico amplificado se purifica según procedimientos convencionales de extracción con fenol y se somete a una digestión enzimática doble usando las enzimas Xba I y EcoR I (NEB, USA). De esta forma queda preparado el segmento génico que codifica para el TGF α maduro.

10 Ejemplo 2: Obtención del vector de expresión de la proteína fusionada TGF α -P64K.

- Se utilizó el vector de expresión pM 92 (CIGB, Cuba) que contiene el gen *lpaA* que codifica para la proteína de *Neisseria meningitidis* P64K (cepa B365) bajo el promotor del operón de triptofano de *E. coli* (*trp*) y el terminador transcripcional de fago (tT4). El pM 92 confiere resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Se transforma una cepa de *E. coli* Dam- (GC-366) con el vector pM92 y se purificó el ADN plasmídico utilizando un juego de reactivos comerciales (Qulagen) según las recomendaciones de los fabricantes. El vector PM 92 se digirió y se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Seguidamente se unió el vector PM92 con el ADNc correspondiente al hTGF α maduro anteriormente preparado, usando la enzima T4 ligasa (Gibco BRL). El plásmido resultante pMTGF codifica para la proteína de fusión que contiene el h-TGF α insertado entre el aminoácido 45/46 de la P64K. Este plásmido recombinante fue verificado por análisis de restricción en geles de agarosa, análisis de la secuencia de ADN secuencia 2.0 (Amersham-USB), y finalmente, análisis de la expresión de la proteína de fusión en la cepa MM299 de *E. coli*, mediante la técnica de "Western Blotting" usando un anticuerpo monoclonal específico contra h-TGF α (R&D System). La figura 2 muestra un esquema del proceso de obtención del vector de expresión pMTGF que codifica para la proteína de fusión TGF α -P64K.

30 Ejemplo 3: Obtención del vector de expresión de la proteína fusionada TGF α -P64K con seis histidinas en el extremo N-Terminal (pMHistGF α).

El vector de expresión pMHisTGF α se construyó siguiendo el mismo protocolo descrito en el ejemplo anterior utilizando como vector el PM224, que incluye un segmento codificante para seis histidinas en el extremo N-terminal de la P64K. La inclusión de un segmento que codifica para seis histidinas presenta ventajas en la purificación de la proteína por afinidad del mismo a quelatos metálicos.

Ejemplo 4: Purificación de la proteína de fusión TGF α -P64K.

Se cultivaron bacterias de *E. coli* (cepa MM299) que expresan la proteína de fusión TGF α -P64K en medio de cultivo LBA (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y 50 mg/L de ampicilina) por 10 horas a 37°C. Después de la recolección de las células, todos los pasos fueron realizados de 0-4°C. La ruptura de la bacteria se realizó utilizando una prensa francesa a 1500 kg/cm², y se removió la fracción insoluble mediante centrifugación a 11,000xg por 30 minutos. Como primer paso de purificación se llevó a cabo una precipitación al 40% de sulfato de amonio, que removió algunas de las proteínas contaminantes de *E. coli*. El precipitado resultante fue removido mediante centrifugación a 11,000 xg, 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante fue fraccionado mediante cromatografía de interacciones hidrofóbicas (TSK-butyl, Pharmacia, Sweeden), con un gradiente decreciente de sulfato de amonio del 40% al 0% en tampón Tris-Cl, pH= 7.2, que contiene 0.15M de cloruro de sodio. Seguidamente la muestra resultante se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna G200 (Pharmacia) equilibrada con PBS 1X, mostrando un nivel de pureza del 95%. La concentración de proteínas se determina usando el método de Lowry y cols ((1951)J.Biol.Chem. 191, 495-498). La caracterización de la proteína fusionada se llevo a cabo mediante la técnica de "Western Blotting" , usando anticuerpos específicos contra P64K y TGF α .

Ejemplo 5: Purificación de la proteína de fusión HisTGF α -P64K.

Se cultivaron bacterias de *E. coli* (cepa MM299) que expresan la proteína de fusión HisTGF α -P64K en medio de cultivo LBA (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y 50 mg/L de ampicilina) por 10 horas a 37°C. Después de la recolección de las células, todos los pasos fueron realizados de 0-4°C. La ruptura de la bacteria se realiza utilizando una prensa francesa a 1500 kg/cm², y se remueve la fracción insoluble mediante centrifugación a 11,000xg por 30 minutos. Como primer paso de purificación se lleva a cabo una precipitación al 40% de sulfato de amonio,

que remueve algunas de las proteínas contaminantes de E. coli. El precipitado resultante fue removido mediante centrifugación a 11,000 xg, 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante fue fraccionado mediante cromatografía de Interacciones de afinidad por quelatos metálicos (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Sweden),
5 debido a la presencia de seis histidinas en la proteína, con un gradiente creciente de imidazol de 25 mM a 500 mM en tampón Tris-Cl, pH= 5.5, que contiene 0.5 M de cloruro de sodio. Seguidamente la muestra resultante se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna G25 (Pharmacia) equilibrada con PBS 1X para eliminar las sales, mostrando un nivel de pureza del 95%. La
10 concentración de proteínas se determinó usando el método de Lowry y cols (1951) J. Biol. Chem. 191, 495-498). La caracterización de la proteína fusionada se llevó a cabo mediante la técnica de "Western Blotting", usando anticuerpos específicos contra P64K y TGF α .

Ejemplo 6: Reconocimiento de la proteína recombinante TGF α -P64K por un anticuerpo monoclonal (AcM) específico por el hTGF α .
15

Con el objetivo de determinar si el TGF α podía ser reconocido por un AcM anti-hTGF α comercial (Calbiochem) en el contexto de la proteína fusionada, realizamos la técnica de "Western Blotting". Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando 25 μ g de las proteínas EGF-P64K, TGF α -P64K ó P64K por
20 duplicado y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m según los procedimientos convencionales. Después de la transferencia las membranas se incubaron con una solución bloqueadora de TBS 1X mas 5% de leche descremada por toda la noche a 4 °C. Luego de un breve lavado con TBS 1X-Tween 20 (0.05%), las membranas se incubaron , una replica con un anticuerpo
25 anti-P64K (1/ 500) (Fig.3A) y la otra con un AcM anti-TGF α (1/100) (Fig.3B) por dos horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron tres lavados con la misma solución y se incubaron las membranas con un antisuero anti-inmunoglobulinas totales de ratón 1/1000 conjugado con fosfatasa alcalina por una hora en iguales condiciones. Finalmente se le añadió 0.004 g de sustrato Fast Red (Sigma) en tampón Tris-Cl 0.1 M pH=8.2 que contiene 0.004 g de Naphtol AS-MX Fosfato (Sigma) y 400 μ L de NN'Dimetil Formamida en 20 mL. La reacción se
30 detuvo con lavados iguales a los descritos con anterioridad. Se observó un

reconocimiento específico del AcM anti-hTGF α por la proteína TGF α -P64K (Fig. 3). Los resultados obtenidos demuestran que el TGF α en la proteína de fusión mantiene una estructura capaz de ser reconocida por un anticuerpo específico.

Ejemplo 7: Obtención de un conjugado químico hTGF α -P64K.

- 5 Se mezcló un mililitro de TGF α en PBS/MgCl₂ 10 mM a una concentración de 2 mg/mL con un mililitro de P64K a 2 mg/mL en el mismo solvente. Se añadió 0.2 mL de glutaraldehído al 0.5% para una concentración final de 0.05%. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se dializó contra una solución de PBS 1X/MgCl₂ 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realizó
- 10 una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Ejemplo 8: Obtención de una proteína de fusión entre el hTGF α , hEGF y P64K.

- El gen que codifica para el hEGF (150 pb) se amplifica mediante PCR a partir del
- 15 plásmido pBEF 10 que contiene al hEGF completo clonado en el sitio EcoR V del vector comercial pBluescript SK II (Stragene). El ADN obtenido de esta manera se une al vector pMHsTGF α en un sitio Bam HI que se encuentra en el final del extremo C-terminal de la P64K utilizando la metodología descrita en el ejemplo 2. De esta manera se obtiene el vector pMTGF α -EGF que codifica para la proteína de
- 20 fusión TE-P64K

Ejemplo 9: Obtención de un conjugado químico hTGF α -hEGF-P64K.

- Se mezcló un mililitro de hTGF α en PBS/MgCl₂ 10 mM a una concentración de 3 mg/mL con un mililitro de hEGF a 3 mg/mL y P64K a 3 mg/mL en el mismo solvente. Se añadió 0.6 mL de glutaraldehído al 0.5% para una concentración final de 0.05%.
- 25 La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se dializó contra una solución de PBS 1X/MgCl₂ 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realizó una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C hasta su uso.

30 **Ejemplo 10: Preparación de formulaciones que contienen hTGF α .**

Los diferentes preparados inmunogénicos descritos en los ejemplos 2, 3, 7, 8 y 9 se mezclaron con Al(OH)₃ ó Montarilde ISA 51 según se describe en la descripción

detallada de la invención. Se utilizaron cantidades que equivalen a 50 µg de hTGFα en todos los preparados y 50 µg de hTGFα y hEGF, en el caso de las vacunas combinadas descritas en los ejemplos 8 y 9. Se utilizó 2mg de Al(OH)₃ por cada preparado de proteína fusionada o conjugado químico de hTGFα ó hEGF que
5 contiene 50 µg equivalentes de cada factor de crecimiento respectivamente.

Ejemplo 11: Preparación de una vacuna combinada que contiene la proteína TGFα/P64K y la proteína EGF/P64K.

Se mezclaron 0.6 mg de cada una proteína, lo que equivale a 50 µg de cada uno de los dos factores de crecimiento, en un volumen total de 0.5 mL y se unió con igual
10 volumen de Montanide ISA 51 y se agitó 10 minutos a temperatura ambiente antes de la inyección.

En el caso de utilizar Al(OH)₃ como adyuvante, se mezclaron dos preparados vacunales que contienen 0.6 mg de proteína cada una de las proteínas antes mencionadas en 0.5 mL final adsorbidos en 2 mg de Al(OH)₃.

15 Ejemplo 12: Preparación de una vacuna combinada que contiene un conjugado químico TGFα/P64K y EGF/P64K.

Se mezcló 0.25 mL de un preparado inmunogénico que contiene 50 µg de TGFα unido a P64K según lo descrito en el ejemplo 7 con 0.25 mL de un preparado inmunogénico de iguales características que contiene hEGF y se mezcló con 0.5 mL
20 de Montanide ISA 51 según lo descrito en el ejemplo 10, utilizando una jeringuilla, por un período de 10 minutos a temperatura ambiente.

En el caso de utilizar Al(OH)₃ como adyuvante, se mezclaron 0.5 mL de cada uno de los conjugados químicos antes descritos que contenían 50 µg de hTGFα y hEGF respectivamente adsorbidos en 2 mg de Al(OH)₃.

25 Ejemplo 13: Inmunogenicidad de la TGFα-P64K / Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide ISA 51) en el modelo murino.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad, ratones de la cepa Balb/c, hembras entre 6-8 semanas fueron inyectados por vía subcutánea con 50 µg (5µg equivalentes de TGFα), 110µg (10µg) ó 0,6 mg (50µg) de la TGFα-P64K en una
30 proporción 1:1 con Montanide ISA 51. El inmunógeno se preparó según lo descrito en la descripción detallada de la invención agitándose por 10 minutos antes de la inmunización. Cada animal recibió 4 dosis quincenales. Se realizaron extracciones

de sangre previo a la primera dosis, una semana después y cada dos semanas a partir de ese momento. El suero se separó de la sangre extraída de los animales y se determinó el título de anticuerpos específicos contra el hTGF mediante la técnica de ELISA indirecto.

- 5 Brevemente, las placas de ELISA (Costar) fueron recubiertas con 50µL/pozo de una solución de hTGFα a 2.5 µg/mL en tampón carbonato pH= 7.2 é incubadas toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.05%), las placas se bloquearon con una solución de PBS 1X-Tween 20 (0.05%)-SFT (5%) por 1 hora a 37°C. Inmediatamente se añadieron los sueros de los ratones inmunizados, y se
- 10 Incubaron por 2 horas a 37°C. Luego de lavar las placas nuevamente, se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-Inmunoglobulinas totales de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1/1000 en PBS 1X-Tween 20 (0.05%)-SFT (5%) (50µL /pozo) por 1 hora a igual temperatura. Finalmente, luego de volver a lavar las placas de la misma manera, se añadió el sustrato de la enzima (p-
- 15 nitrofenilfosfato(Sigma)) a una concentración de 1 mg/mL en tampón Dietanolamina pH=9.8 (50µL /pozo). La absorbancia del complejo enzima-sustrato formado se midió en un lector de ELISA a 405 nm.

En la figura 4 se observa la cinética de la respuesta polivalente de anticuerpos anti-hTGFα obtenida en ratones inmunizados con la TGFα-P64K.

- 20 Debido a la alta homología entre el hTGFα y el de rata ó ratón (93%) se puede considerar que la respuesta generada contra el hTGFα como una respuesta contra el TGFα análogo.

Ejemplo 14: Inmunogenicidad de la TGFα-P64K / Al(OH)₃ en el modelo murino.

- Se realizó un protocolo de inmunización según lo descrito en el ejemplo anterior,
- 25 utilizando 2 mg Al(OH)₃ como adyuvante. El inmunógeno se preparó según lo descrito en la descripción detallada de la invención . Se obtuvieron títulos de anticuerpos específicos por TGFα de hasta 1/10000. La técnica utilizada para determinar el título de anticuerpos anti-TGFα fue la de ELISA indirecto descrita en el ejemplo 13.

- 30 **Ejemplo 15: Distribución de las subclases de Inmunoglobulinas de isotipo IgG en los ratones inmunizados con la proteína TGFα-P64K / Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide ISA 51) en el modelo murino.**

Se determinó la distribución de subclases IgG obtenida mediante la técnica de ELISA Indirecto descrita en el ejemplo 13, utilizando antisueros específicos contra la diferentes subclases de IgG murino conjugados con biotina (Jackson) a una dilución de 1/1000 y posteriormente el complejo estreptavidina-fosfatasa (1/1000).

- 5 Se determinó la proporción de cada una de las subclases de IgG con respecto a la IgG total en el suero de los animales inmunizados con 50 µg de TGFα en la proteína fusionada usando la vía subcutánea (Grupo 1) o intramuscular (Grupo 2) siguiendo el protocolo de inmunización descrito en el ejemplo 13. En la figura 5 se observa la distribución de subclases obtenida. Se obtuvo una mayor proporción de IgG1 en los
- 10 dos grupos de ratones utilizados en el estudio.

• **Ejemplo 16: Determinación de la capacidad de los sueros de los animales inmunizados con la proteína TGFα-P64K / Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide ISA 51) de Inhibir la unión del TGFα-I¹²⁵ mediante la técnica de "radio receptor assay"(RRA).**

- 15 Con el objetivo de determinar si los anticuerpos generados en los protocolos de inmunización descritos anteriormente eran capaces de inhibir la unión del TGFα a su receptor , se realizó un ensayo *in vitro* denominado RRA. En síntesis, los sueros de los ratones inmunizados según se describe en el ejemplo 13 se incubaron con una mezcla que incluye 100 µL de membrana de placenta humana y 20 µL de TGFα-I¹²⁵
- 20 (100000 cpm) y 330 µL de tampón Tris-Cl 10 mM, MgCl₂ 10 mM y BSA al 1%, pH=7.4. El marcaje de TGFα se realizó mediante el método de la cloramina T (Hunter y Greenwood (1962, Nature, 358:495-498). La mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se detuvo la reacción con 1 mL del tampón antes mencionados. Finalmente se centrifugaron los tubos a 1000 rpm por 30 minutos. Las
- 25 células sedimentadas se lavaron y dejaron secar. La radioactividad se midió en un contador gamma (Wallac, Finlandia). La caída en los valores de radioactividad medidos indica la inhibición del enlace entre el TGFα y su receptor, debida a la acción de los sueros ensayados. Se obtuvo un porcentaje de inhibición entre un 50%-80% en todos los sueros ensayados.

Ejemplo 17: Determinación de la respuesta sérica contra el EGF humano (hEGF) generada por la inmunización con la proteína TGF α -P64K.

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-EGF en los sueros de los ratones que mostraron altos títulos de anticuerpos anti-TGF α , mediante la técnica de ELISA

- 5 Indirecto previamente descrita. Diluciones de 1/100, 1/1000 y 1/10000 de los sueros se enfrentaron a placas recubiertas con hEGF (CIGB). En la figura 6 se muestran los títulos anti-EGF que mostraron los sueros de los animales inmunizados con la proteína TGF α -P64K, como se observa se obtiene respuesta de anticuerpos anti-EGF solamente en un grupo de ratones inmunizados.

- 10 Sin embargo ratones Inmunizados con el conjugado químico EGF-P64K no mostraron ningún nivel de respuesta de anticuerpos anti-TGF α .

Ejemplo 18: Reconocimiento de tumores humanos *in vitro* por un antisuero policlonal anti-hTGF α obtenido por la inmunización con la proteína TGF α -P64K / Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide ISA 51).

- 15 Se utilizó los antisueros policlonales anti-hTGF α obtenidos a partir de la inmunización de ratones con la proteína heteróloga TGF α -P64K en Montanide ISA 51 para determinar la expresión de TGF α en biopsias de tumores incluidas en parafina de pacientes vacunados con la vacuna basaba en EGF. En un paciente con alta respuesta de anticuerpos anti-hEGF, se observó una regresión del tumor
- 20 NSCLC. Sin embargo, después se le detectó un segundo tumor de laringe. Biopsias de estos dos tumores fueron analizadas y se observó una expresión diferencial del EGF y el TGF α en cada una de ellas. En la figura 7 se muestran los valores de reactividad obtenidos con los diferentes monoclonales utilizados. Estos resultados confirman que mediante la inmunización con el preparado vacunal TGF α -P64K se
- 25 generan anticuerpos específicos contra el hTGF α capaces de reconocer a esta molécula en tumores humanos.

Ejemplo 19: Expresión de EGF (ARNm), TGF α (ARNm) y EGF-R (ARNm) en biopsias de carcinomas de mama

- Se extrajo el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de biopsias de tumores de
- 30 mama utilizando el reactivo TRIZOL (Life technologies) y se convirtió ADNc mediante la enzima reverse transcriptasa. El ADNc total se sometió a 30 ciclos de PCR utilizando cebadores específicos para cada una de estas moléculas. Como

control interno se utilizó un gen de mantenimiento celular presente en todas las células (GAPDH). El producto de PCR obtenido se separó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se visualizó con bromuro de etidio.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos al utilizar los cebadores
5 específicos para el EGF, TGF α , EGF-R y GAPDH (Control Interno) en 22
carcinomas de mama. Solamente se observó EGF ARNm en 1/22 biopsias, sin
embargo se observó una alta expresión de TGF α y EGF-R en la mayoría de las
muestras. La correlación entre estas dos moléculas, sugiere la importancia del lazo
autocrino TGF α /EGF-R en el crecimiento de este tipo de tumores (Figura 9).

10 **Breve descripción de las Figuras**

Figura 1: Secuencia genética y aminoacídica (letras subrayadas en negrita) del h-TGF α maduro.

Figura 2: Representación esquemática del proceso de obtención del vector de expresión pMTGF α .

15 **Figura 3:** Reconocimiento de la proteína de fusión TGF α -P64K por anticuerpos
monoclonales anti-P64K (A) y anti-hTGF α (B) mediante la técnica de "Western
Blotting". Se realizó una SDS-PAGE al 10 % de la P64K (1), EGF-P64K (2) y
TGF α -P64K (3) y luego se transfirieron las proteínas a una membrana de
nitrocelulosa donde se incubaron con anticuerpos específicos contra P64K (A) ó
20 TGF α (B) con el objetivo de caracterizar la proteína fusionada entre el TGF α y la
P64K.

Figura 4: Cinética de la respuesta de anticuerpos anti-hTGF α : Los títulos de
anticuerpos específicos contra el hTGF α fueron medidos mediante la técnica de
ELISA indirecto. Los ratones fueron inmunizados con 5 μ g (A), 10 μ g (B) y 50 μ g (C)
25 de TGF α -equivalente en la proteína TGF α -P64K en Montanide ISA 51. Las abscisas
representan los días en que se obtuvieron las muestras de suero de cada ratón
individual y las ordenadas el recíproco de los títulos de anticuerpos alcanzados. Los
día de Inmunización se señalan con flechas en el gráfico A (Día 0, 14, 28 y 42).

Figura 5: Distribución de subclases de los anticuerpos inducidos a partir de la
30 inmunización con 50 μ g de TGF α -equivalente en la proteína fusionada. Comparación
de la proporción de subclases de IgG en la respuesta de anticuerpos inducida con la
inmunización de la proteína TGF α -P64K por vía subcutánea (1) ó intramuscular (2).

Los valores de desviación estándar se muestran en la figura para cada uno de los grupos de 5 animales inmunizados.

Figura 6: Respuesta de anticuerpos específicos por el hEGF en ratones inmunizados con la proteína de fusión TGF α -P64K. En la tabla se muestran los valores del título de anticuerpos anti-TGF α y anti-EGF en ratones inmunizados con TGF α -P64K.

Figura 7: Determinación por métodos Inmunohistoquímicos de la presencia de EGF-R, EGF y TGF α en biopsias de tumores de un paciente vacunado incluido en el ensayo clínico piloto II de vacuna EGF. La reactividad diferencial de estas tres moléculas en el tumor primario de pulmón y de un segundo tumor primario de laringe que apareció con posterioridad, se muestran con signos positivos en la figura.

Figura 8: Expresión de ARNm de EGF, TGF α y EGF-R en 22 carcinomas de mama. En la figura se muestran los productos de 30 ciclos PCR obtenidos con los cebadores específicos para cada molécula y visualizados con bromuro de etidio después de ser separados en geles de agarosa al 1.5%. También se observa la expresión de ARNm de GAPDH utilizado como control interno.

Figura 9: Correlación entre los niveles de TGF α ARNm y EGF-R ARNm en biopsias de carcinoma de mama: La intensidad de las bandas obtenidas con bromuro de etidio se analizó mediante un programa de computación (imagQuant, Amersham).

El eje de las x muestra los valores de intensidad para los productos de PCR utilizando cebadores específicos para EGF-R entre los obtenidos con GAPDH, para cada una de las muestras y el eje de las y muestra los mismo pero para el TGF α . Se observó una correlación positiva entre la expresión de las dos moléculas, $R^2= 0.657$, $p=0.00121$.

REVINDICACIONES

- 1- Una composición vacunal capaz de producir una respuesta inmune específica contra el TGF α autólogo, caracterizada porque comprende como principio activo
5 TGF α autólogo o cualquier derivado del mismo y un adyuvante apropiado.
- 2- Una composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende TGF α humano recombinante.
- 3- Una composición vacunal capaz según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizada porque emplea como principio activo TGF α autólogo solo o en combinación con
10 otros ligandos del EGF-R.
- 4- Una composición vacunal capaz según las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizada porque el TGF α autólogo y los ligandos del EGF-R que se emplean como principios activos, pueden ser opcionalmente enlazados a una proteína transportadora, tanto por conjugación química como genéticamente.
- 15 5- Una composición vacunal según la reivindicación 4, caracterizada porque comprende la proteína P64K de *Neisseria meningitidis* como proteína transportadora.
- 6- Una composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque comprende como principio activo un conjugado químico entre TGF α y P64K de
20 *Neisseria meningitidis*.
- 7- Una composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque comprende como principio activo un conjugado químico entre el TGF α y la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, y adicionalmente EGF.
- 8- Una composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque
25 comprende como principio activo una proteína de fusión recombinante entre el TGF α y la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*.
- 9- Una composición vacunal según la reivindicación 8, caracterizada porque comprende una proteína de fusión recombinante entre el TGF α y la P64K de *Neisseria meningitidis*, la cual presenta una cola de seis histidinas en el extremo
30 N-terminal de dicha proteína P64K.

- 10- Una composición vacunal según reivindicación 9 caracterizada porque comprende como principio activo una proteína de fusión recombinante entre el $TGF\alpha$, la proteína P64K de *Neisseria meningitidis* y el EGF.
- 5 11- Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque comprende Adyuvante Incompleto de Freund como adyuvante.
- 12- Una composición vacunal según la reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque comprende $Al(OH)_3$ como adyuvante.
- 10 13- Método para el control del crecimiento y/o proliferación celular en tumores de origen epitelial que expresan $TGF\alpha$ y otros ligandos del EGF-R, caracterizado porque se emplea la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12.
- 15 14- Método según la reivindicación 13 para el tratamiento de tumores como carcinomas epidermoides de pulmón, mama, próstata, gástrico, y de ovario caracterizado porque se emplea la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12.

1/5

Figura 1

1-V V S H⁺ F N D C₂ P₂ D⁺ S H⁺ T O F
 OTG-GTG-TCC-CAT-TTT-AAT-GAC-TGC-CCA-GAT-TCC-CAC-ACT-CAG-TTC
 C₁₄ F H⁺ G T C₁₁ R⁺ F L V O E D⁺ K⁺ P₂₀
 TGC-TTC-CAT-GCA-ACC-TGC-ACG-TTT-TTG-OTG-CAG-GAG-GAC-ACG-CCA-
 A C₂ V C₁₄ H⁺ S G Y V G A R⁺ C₂ F H⁺
 GCA-TGT-GTC-TGC-CAT-TCT-GCG-TAC-OTT-GGT-GCA-CGC-TGT-GAG-CAT-
 A D L L A -50
 GCG-GAC-CTC-CTG-GCC

Figura 2

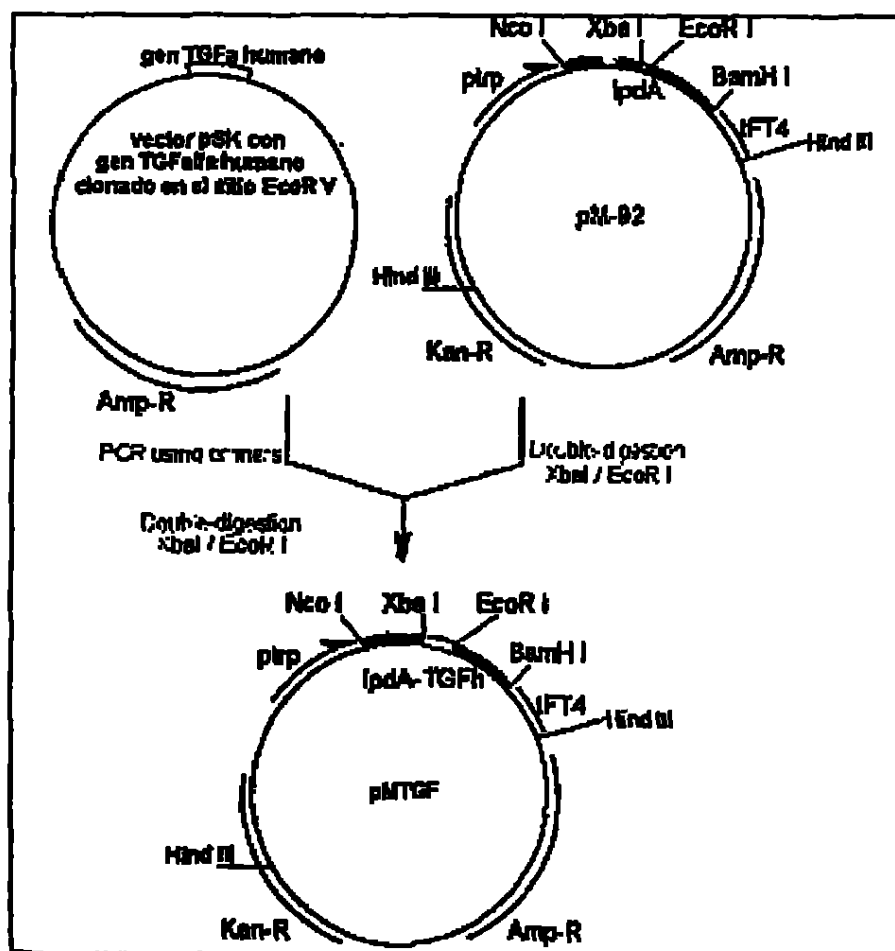


Figura 3

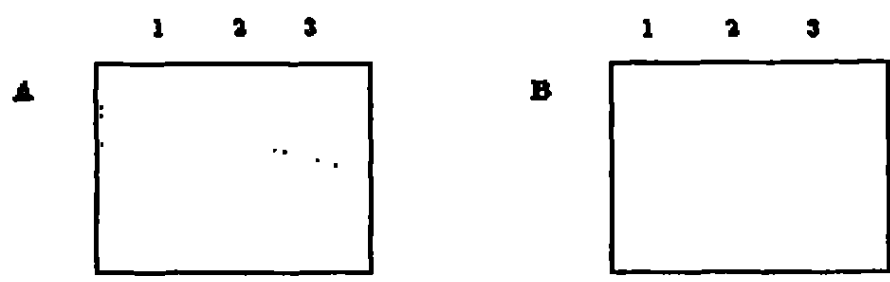


Figura 4

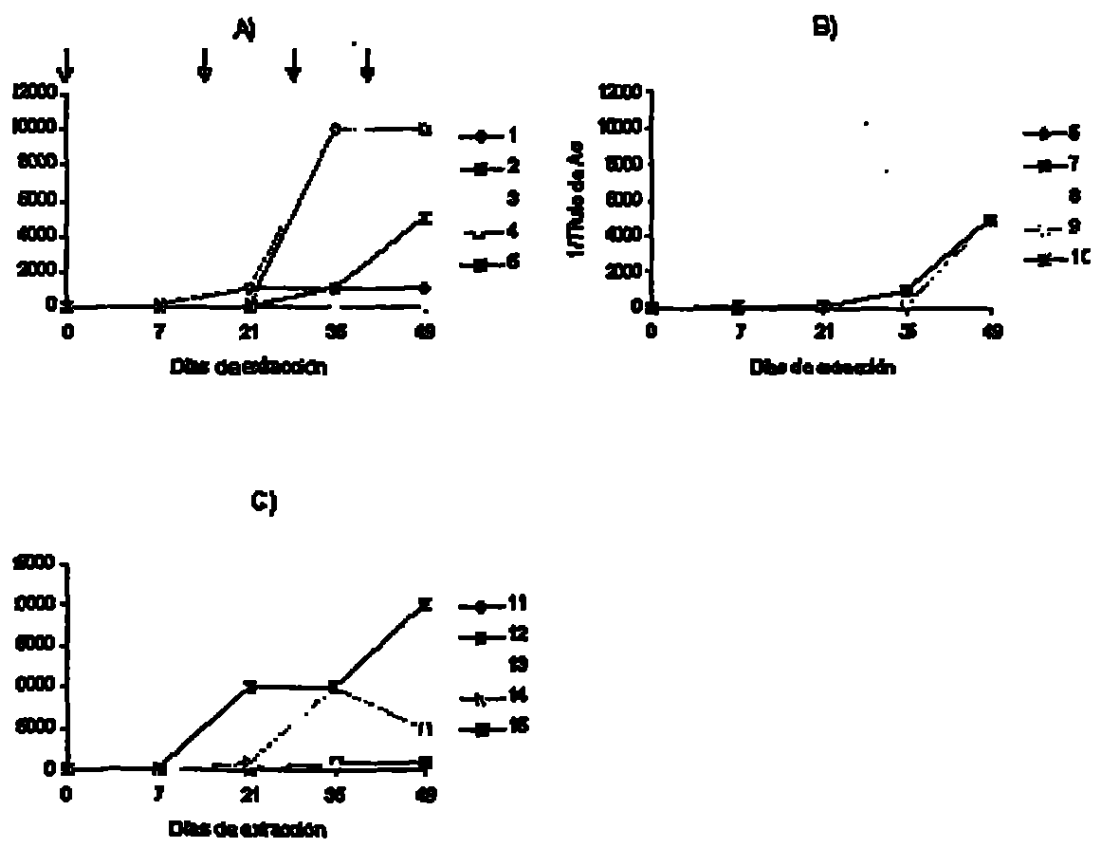


Figura 5

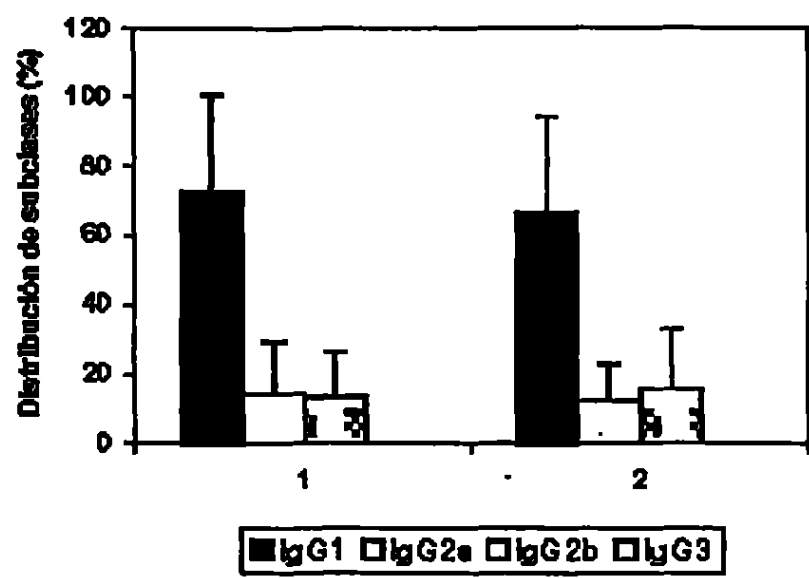


Figura 6

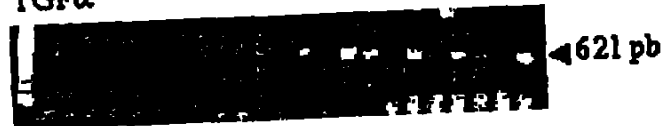
Ratón	1/Título TGFα	1/Título EGF
1	10000	5000
2	10000	100
3	10000	5000
4	10000	1000
5	20000	1000
6	10000	5000
7	10000	5000
8	10000	1000
9	10000	100
10	10000	100
11	10000	100
12	10000	100

Figura 7

	Pulmón	Laringe
EGF-R	+++	+++
EGF	+++	+
TGF α	+	+++

Figura 8

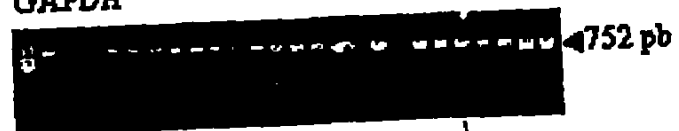
EGF

TGF α 

EGF-R

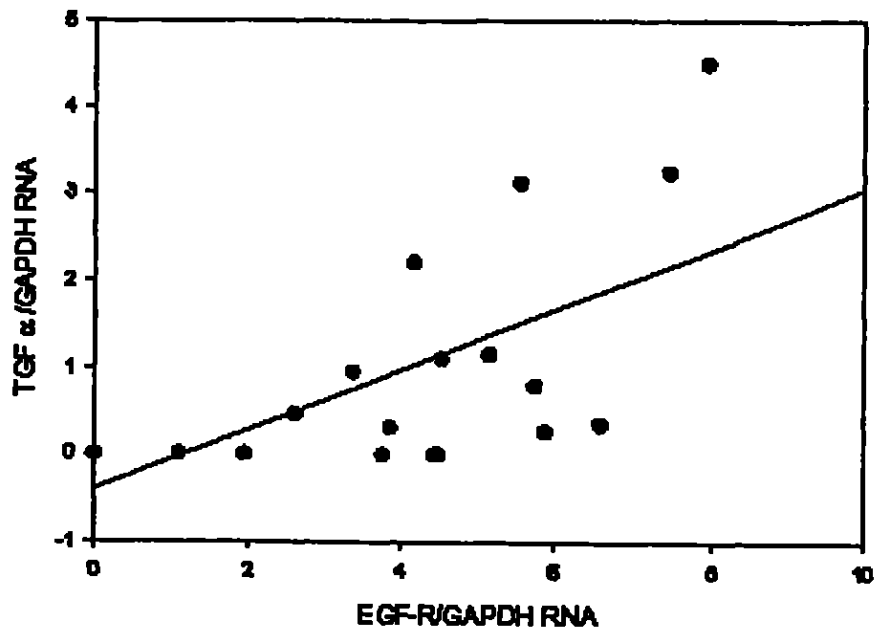


GAPDH



5/5

Figure 9



COMPOSICIÓN VACUNAL QUE CONTIENE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE ALFA.

Sector Técnico

5 La presente invención está relacionada con el campo de la inmunología y la medicina humana, en particular con un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración contra el TGF alfa ($\text{TGF}\alpha$) autólogo, la que puede ser utilizada para el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas y otras enfermedades relacionadas con el $\text{TGF}\alpha$.

10 Técnica Anterior

El Factor de Crecimiento Transformante alfa, $\text{TGF}\alpha$ siglas en Inglés, es un polipéptido de 50 aminoácidos, originalmente aislado del medio de cultivo de células transformadas por retrovirus. En un inicio se definió como una molécula capaz de competir con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, siglas en Inglés) por la unión al EGF-R. Sin
15 embargo, anticuerpos anti-EGF no fueron capaces de reconocer al $\text{TGF}\alpha$ (Todaro et al. (1976), Nature 264, 26-31), por lo que desde entonces se conoce que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

El $\text{TGF}\alpha$ forma parte de la familia del EGF, que esta constituida por proteínas relacionadas estructural y funcionalmente. Los otros miembros de esta familia son:
20 EGF, 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 EGF-R, así que son conocidas como ligandos del mismo y juegan un papel importante en el crecimiento de células normales y neoplásicas en menor o mayor grado.

El EGF-R es una glicoproteína de 170 kD aproximadamente, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular de este receptor está 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.)

El TGF α es sintetizado en forma de un precursor de membrana (pro-TGF α), de 160 aminoácidos y mediante proteólisis enzimática se libera una proteína soluble de 150 aminoácidos aproximadamente, el TGF α maduro.

El TGF α humano (hTGF α) muestra un 43% de identidad en la secuencia aminoacídica con el EGF humano (hEGF) y un 93% con el TGF α de ratón ó rata. Además sus efectos biológicos no son especie específicos.

El trabajo de muchos laboratorios ha documentado la habilidad del TGF α de regular la proliferación, migración y diferenciación de células en cultivo (Carpenter y Wahl. (1990), Springer-Verlag, Berlín, pp.69-171.)

El TGF α es el ligando del EGF-R más expresado. Se expresa en tejidos normales durante la embriogénesis y en tejidos adultos normales y tumorales. Sin embargo, no se observan defectos patológicos mayores en ratones TGF α "Knock-out" y estos ratones son viables y fértiles (Bruce Mann y cols.(1993), Cell, 73, 249-261.).

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

En tumores de origen epitelial se han detectado altos niveles de EGF-R y en muchos casos, la sobreexpresión de este receptor constituye un indicador de mal pronóstico.

La inducción de $TGF\alpha$ es un evento frecuente en la transformación neoplásica. De hecho, se han realizado numerosos estudios que muestran la sobreexpresión de esta
5 molécula en tumores epiteliales de distintas localizaciones, que incluyen, mama, pulmón, cerebro, hígado, próstata, vejiga, tracto gastrointestinal, colon, recto, tejido reproductivo (ovario) y endocrino, entre otros.

Aunque el mecanismo de inducción de tumorigenicidad por el $TGF\alpha$ es aún desconocido, si existen algunos reportes que correlacionan la sobreexpresión de este
10 factor de crecimiento con el grado del tumor, la sobrevida de pacientes y otros marcadores tumorales. Algunos investigadores han demostrado su relación con otros oncogenes como c-myc en hepatocarcinomas, además constituye un blanco del gen supresor de tumores (VHL) (Sumarizado en Lee y cols. (1996), Growth Factors and Cytokines in Health and Disease, Volume 1B, 277-318.).

15 Aunque el $TGF\alpha$ y el EGF se unen al mismo receptor con afinidades comparables, generalmente el $TGF\alpha$ es más potente que el EGF, y en algunos contextos, sus efectos se han descrito como más fuertes y/o más prolongados (Barrandon and Green (1987), Cell 50, 1131-1137). Se ha reportado que en el caso de la internalización del complejo $TGF\alpha$ /EGF-R, tanto el $TGF\alpha$ como el EGF-R son preferiblemente reciclados a la
20 superficie mientras cuando el complejo EGF/EGF-R es internalizado en el mismo tipo celular, los dos componentes son eficientemente degradados (Ebner y Derynck (1991), Cell Regul.2,599-612), lo que sugiere que las diferencias en la actividad biológica puede estar dada por diferencias en los mecanismos que ocurren en el interior celular. Por otra parte el $TGF\alpha$ es un factor angiogénico más potente que el EGF (Schreiber y
25 cols.(1986), Science 232, 1250-1253.)

En cuanto a la expresión en tumores, aun cuando hay evidencias de la presencia del precursor de EGF en membranas de algunos tumores epiteliales, el TGF α es expresado por una mayor cantidad de tumores del mismo origen, y se plantea que su acción, a diferencia del EGF, es principalmente mediante la formación de un lazo autocrino con el EGF-R. Por otra parte, resultados obtenidos indican que en biopsias de tumores epiteliales de algunos tipos, se observa la presencia de TGF α y no EGF (carcinoma ductal de mama, laringe), mientras otros tumores presentan más EGF que TGF α (cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Estos resultados sugieren que los factores de crecimiento pueden tener impactos diferentes en la biología tumoral de la célula neoplásica blanco.

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 autólogo (Patente US 5,984,018). De hecho, se han obtenido evidencias tanto preclínicas como clínicas acerca de la inmunogenicidad y la baja toxicidad provocada por la vacunación con hEGF unido a una proteína transportadora (González y cols.(1996), Vaccine Research 5(4), 233-243.) Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con hEGF en adyuvante, incrementa la sobrevida de ratones transplantados con el tumor ascítico de Erlich (TAE) (González y cols. (1996),Vaccine Research 5(4), 233-243.).

Se realizó una construcción genética de una proteína de fusión que contiene la secuencia del hEGF insertada entre el aminoácido 45/46 de la P84K. Esta proteína se usó como inmunógeno en ratones, provocando una respuesta inmune humoral específica contra el hEGF con impacto en el aumento de sobrevida de animales

transplantados con células de TAE. (González y cols (1997), Vaccine Research 6(2), 91-100.)

En dos ensayos clínicos pilotos realizados con pacientes con NSCLC, se observó una tendencia en el aumento de la sobrevida de los pacientes vacunados cuando se comparan contra un control histórico. En los pacientes con alta respuesta sérica contra el hEGF se observó un marcado incremento en la sobrevida (González y cols.(1998), Annals of Oncology 9, 1-5.).

En sentido general la vacunación con EGF no genera una respuesta de anticuerpos específicos contra el TGF α . Sin embargo existen evidencias que la vacunación con un preparado inmunogénico que contiene TGF α en el modelo murino genera un nivel de anticuerpos anti-EGF solamente en algunos ratones. Dicha respuesta en algunos casos es capaz de bloquear la unión EGF a su receptor en un ensayo *in vitro*, sin embargo los niveles de anticuerpos anti-EGF obtenidos no son suficientes para generar una respuesta de inmunocastración del EGF con impacto en la respuesta antitumoral.

Debido a que la acción de cada uno de estos dos factores de crecimiento es diferente en cada tumor y/o entre el tumor primario y sus metástasis, una vacuna que combine los dos ligandos principales del EGF-R, TGF α y EGF, tendría un efecto antitumoral superior en los tumores de origen epitelial, en sentido general.

Hasta el momento no existe ninguna terapia conocida que involucre la utilización de un preparado vacunal que contenga TGF α humano (hTGF α) o cualquier derivado del mismo, o una combinación de éste con otro ligando del EGF-R, EGF, en la inmunoterapia activa de cáncer.

Divulgación de la invención

La presente invención provee una composición vacunal que contiene TGF α humano o cualquier derivado del mismo de cualquier origen, unido genéticamente (proteína de

fusión recombinante) ó acoplado por métodos químicos a una proteína transportadora, capaz de inhibir el crecimiento de tumores de origen epitelial, a través de un efecto de inmunocastración, sin efectos colaterales de importancia. También provee de una composición vacunal que contiene una combinación de hTGF α o cualquier derivado con hEGF o cualquier derivado unidos a una proteína transportadora.

La composición vacunal puede ser utilizada en el tratamiento de tumores de origen epitelial dependientes de TGF α ó TGF α /EGF, o en cualquier otra enfermedad asociada con el TGF α tales como la psoriasis (Kapp, A (1993) J Dermatol Sci , Jun;5(3):133-42).

En la especificación de TGF α , se incluye cualquier fragmento y/o derivado del TGF α que tenga propiedades inmunológicas y/o efectos semejantes a la molécula original. Los derivados incluyen, pero no se excluyen otros, sustituciones originales de aminoácidos, cambio de aminoácidos sitio específico que incrementen la estabilidad y/o la actividad, modificaciones químicas, entre otras.

Más específicamente la invención consiste en un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración contra el TGF α autólogo, que pueda ser utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas y otras enfermedades relacionadas con el TGF α .

Por otra parte dicha invención incluye la utilización de un preparado vacunal constituido por una combinación de TGF α y EGF, para el tratamiento de neoplasias malignas que dependan de estos dos factores de crecimiento en el curso de su patogénesis.

1- Preparaciones inmunogénicas:

En la presente invención se utiliza un preparado vacunal que incluye hTGF α unido a una proteína transportadora por métodos de ingeniería genética (proteína de fusión recombinante) o por métodos químicos de conjugación. El hTGF α utilizado en cualquiera de las preparaciones inmunogénicas se obtiene tanto de fuente natural,

recombinante ó sintética. Diferentes proteínas pueden ser utilizada como transportadoras. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden utilizar: Toxoide Tetánico, KLH, la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, entre otras. Las cantidades óptimas de hTGF α en la formulación vacunal oscilan entre 5 μ g y 1000 μ g por dosis.

Por otra parte se utiliza un preparado vacunal que contiene una combinación del hTGF α con el hEGF (Oficina de Registro Nacional de Medicamentos, HEBERMIN No 1266).

En la especificación de TGF α ó EGF, se incluye cualquier fragmento y/o derivado del TGF α ó EGF que tenga propiedades inmunológicas y/o efectos semejantes a la molécula original. Los derivados incluyen, pero no se excluyen otros, sustituciones originales de aminoácidos, cambio de aminoácidos sitio específico que incrementen la estabilidad y/o la actividad, modificaciones químicas, entre otras.

A) Obtención de la proteína de fusión TGF α -Proteína transportadora por métodos de Ingeniería genética:

El gen que codifica para el hTGF α (500 pb) se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos. El fragmento de ADN resultante es digerido y ligado en un sitio de unión específico a un vector de expresión en el cual se encuentra clonado el gen que codifica para la proteína transportadora, de manera que la proteína resultante incluye una copia o mas de las dos moléculas. Se puede utilizar cualquier vector de expresión tanto de células superiores (mamíferos) como inferiores (bacterias o levaduras). El vector también puede incluir seis histidinas en el extremo N-Terminal de la proteína transportadora. El plásmido resultante es verificado por análisis de restricción en geles de agarosa, análisis de la secuencia de ADN usando la enzima secuencasa 2.0 (Amersham-USB), y finalmente, análisis de la producción de la proteína de fusión en cualquier cepa de expresión de *Eschericia coli*,

mediante la técnica de "Western Blotting", usando un anticuerpo monoclonal específico contra hTGF α (R&D System). Para obtener la proteína se rompen las paredes bacterianas usando un método de ruptura fuerte y luego se purifica la proteína por una combinación de métodos de precipitación diferencial con sulfato de amonio y métodos
5 cromatográficos. Finalmente, la proteína es filtrada en condiciones estériles y conservada a -20°C o liofilizada y conservada a 4°C hasta su uso posterior.

B) Obtención de conjugados químicos que contienen hTGF α :

Se obtienen diferentes preparaciones que contienen hTGF α conjugado con diferentes proteínas transportadoras (como P64K). En principio se puede utilizar cualquier método
10 de acoplamiento químico. Como método químico preferencial se utiliza el método que utiliza el agente EMCS descrito en la patente norteamericana, U. S. No. 4,302,386; Lee y cols., 1981.

Alternativamente, se puede utilizar el método de conjugación con glutaraldehído. Con este fin, se mezclan estas dos ó tres moléculas a una concentración de 1 mg/mL en la
15 solución final con glutaraldehído al 0.05% (en la solución total). La mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente, y se dializa contra una solución de PBS 1X/MgCl₂ 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realiza una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtra en condiciones estériles y se almacena a 4°C hasta su uso.

20 C) Obtención de una vacuna que combine el hTGF α y el hEGF.

La obtención de una vacuna que combine los dos principales ligandos del EGF-R puede realizarse de diferentes maneras:

- 1- Unión de las dos vacunas que contienen el hTGF α o el hEGF por separado unido a una proteína transportadora en una relación 1:1 en el momento de la inyección. Con
25 este fin se pueden utilizar las proteínas de fusión o los conjugados químicos de

ambas moléculas. Las cantidades óptimas de hTGF α y hEGF en la formulación vacunal oscilan entre 5 μ g y 1000 μ g por dosis.

- 2- Obtención de una construcción genética similar a la descrita en la sección A que contenga los dos factores de crecimiento, hTGF α y hEGF o una combinación de cualquiera de sus derivados.
- 3- Obtención de un conjugado químico que contenga el hTGF α , hEGF o una combinación de cualquiera de sus derivados y una proteína transportadora utilizando la metodología descrita en la sección B.

D) Obtención de la preparación Inmunogénica:

- Para potenciar el efecto inmunogénico deseado de las composiciones vacunales, es conveniente usar un adyuvante adecuado y seleccionar un modo de administración en el cual el preparado vacunal exhiba una alta inmunogenicidad.

Las composiciones vacunales referidas en esta invención son adyuvadas de dos maneras específicas

- 1) En Al(OH) $_3$ formando soluciones acuosas del preparado vacunal adsorbido a este compuesto. De 5 μ g a 1000 μ g de TGF α por dosis de inmunógeno se unen a un rango entre 2 y 5 mg de Al(OH) $_3$ y se deja en agitación por espacio de 1 hora. La solución final se conserva a 4°C hasta su uso posterior.
- 2) En adyuvante incompleto de Freund que permitan la formación de emulsiones acuosas/oleosas u oleosas/acuosas. Las cantidades de inmunógeno y adyuvante en la composición final se encuentran en un rango volumen / volumen de 40/60 a 60/40. Los volúmenes dependen de la emulsión final deseada. El adyuvante se añade antes de la inmunización y se agita por un periodo de 10 a 30 minutos, a temperatura ambiente.

Los volúmenes finales de cada inmunógeno cubren el rango adecuado para la ruta correspondiente.

En el caso de las vacunas que se conjugan en el momento de la inyección descritas en la sección C 1, las dos vacunas adyuvadas como se ha descrito anteriormente se
5 pueden tanto unir por agitación e inyectar o inyectar por separado.

La administración de las composiciones vacunales se pueden realizar por diversas rutas: vía intramuscular, vía subcutánea, vía intranasal y vía intradérmica.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN.

**Ejemplo1: Obtención del segmento de ADN que codifica para TGF α maduro por
10 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .**

A partir de un vector comercial pBluescript KS⁺ que tiene clonado en un sitio ECOR V la cadena complementaria de ADN (ADNc) del hTGF α (PSK-TGF α) (CIGB, Cuba) , se amplificó la secuencia de 150 aminoácidos correspondiente al TGF α maduro (Fig.1) usando los cebadores específicos para el hTGF α maduro:

15 **N-Terminal:5'- GCTCTAGAAGTGGTGTCCCATTTTAATGAC-3' (Subrayado ,
secuencia de corte de la enzima de restricción XbaI)**

**C-Terminal: 5'-CGGAATTCGCCAGGAGGTCCGCATGCTCAC-3' (Subrayado,
secuencia de corte de la enzima de restricción EcoRI)**

Brevemente, Se utilizaron 200 ng del PSK TGF α en 75 μ L de una mezcla que contiene:
20 500ng de cada uno de los cebadores específicos, una mezcla de nucleótidos trifosfatos a una concentración de 200 μ M cada uno, MgCl₂ a 25 mM y 100 Unidades de la enzima Taq Polimerasa (Promega) en solución tampón suministrada por Promega. Se realizaron 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), hibridación (1 minuto a 60°C), y extensión (30 segundos a 72°C). Al primer ciclo se antecedió un tiempo de

desnaturalización de 4 minutos, y después del último ciclo, se llevo a cabo una extensión de 2 minutos.

El producto del PCR se separó por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y el segmento génico amplificado se purifica según procedimientos
5 convencionales de extracción con fenol y se somete a una digestión enzimática doble usando las enzimas Xba I y EcoR I (NEB, USA). De esta forma queda preparado el segmento génico que codifica para el TGF α maduro.

Ejemplo 2: Obtención del vector de expresión de la proteína fusionada TGF α -P64K.

10 Se utilizó el vector de expresión pM 92 (CIGB, Cuba) que contiene el gen *lpaA* que codifica para la proteína de *Neisseria meningitidis* P64K (cepa B385) bajo el promotor del operón de triptofano de *E. coli* (*trp*) y el terminador transcripcional de fago (λ T4). El pM 92 confiere resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Se transforma una cepa de *E. coli* Dam- (GC-366) con el vector pM92 y se purificó el ADN plasmídico
15 utilizando un juego de reactivos comerciales (Quiagen) según las recomendaciones de los fabricantes. El vector PM 92 se digirió y se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Seguidamente se unió el vector PM92 con el ADNc correspondiente al hTGF α maduro anteriormente preparado, usando la enzima T4 ligasa (Gibco BRL). El plásmido resultante pMTGF codifica para la proteína de fusión
20 que contiene el h-TGF α insertado entre el aminoácido 45/46 de la P64K. Este plásmido recombinante fue verificado por análisis de restricción en geles de agarosa, análisis de la secuencia de ADN secuenasa 2.0 (Amersham-USB), y finalmente, análisis de la expresión de la proteína de fusión en la cepa MM299 de *E. coli*, mediante la técnica de "Western Blotting" usando un anticuerpo monoclonal específico contra h-

TGF α (R&D System). La figura 2 muestra un esquema del proceso de obtención del vector de expresión pMTGF que codifica para la proteína de fusión TGF α -P64K.

Ejemplo 3: Obtención del vector de expresión de la proteína fusionada TGF α -P64K con seis histidinas en el extremo N-Terminal (pMHisTGF α).

5 El vector de expresión pMHisTGF α se construyó siguiendo el mismo protocolo descrito en el ejemplo anterior utilizando como vector el PM224, que incluye un segmento codificante para seis histidinas en el extremo N-terminal de la P64K. La inclusión de un segmento que codifica para seis histidinas presenta ventajas en la purificación de la proteína por afinidad del mismo a quelatos metálicos.

10 **Ejemplo 4: Purificación de la proteína de fusión TGF α -P64K.**

Se cultivaron bacterias de E. coli (cepa MM299) que expresan la proteína de fusión TGF α -P64K en medio de cultivo LBA (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y 50 mg/L de ampicilina) por 10 horas a 37°C. Después de la recolección de las células, todos los pasos fueron realizados de 0-4°C. La ruptura de la bacteria se realizó

15 utilizando una prensa francesa a 1500 kg/cm², y se removió la fracción insoluble mediante centrifugación a 11,000xg por 30 minutos. Como primer paso de purificación se llevó a cabo una precipitación al 40% de sulfato de amonio, que removió algunas de las proteínas contaminantes de E. coli. El precipitado resultante fue removido mediante centrifugación a 11,000 xg, 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante fue fraccionado

20 m diante cromatografía de interacciones hidrofóbicas (TSK-butil, Pharmacia, Sweeden), con un gradiente decreciente de sulfato de amonio del 40% al 0% en tampón Tris-Cl, pH= 7.2, que contiene 0.15M de cloruro de sodio. Seguidamente la muestra resultante se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna G200 (Pharmacia) equilibrada con PBS 1X, mostrando un nivel de pureza del 95%. La

25 concentración de proteínas se determina usando el método de Lowry y cols (

(1951)J.Biol.Chem. 191, 495-498). La caracterización de la proteína fusionada se llevo a cabo mediante la técnica de "Western Blotting" , usando anticuerpos específicos contra P64K y TGF α .

Ejemplo 5: Purificación de la proteína de fusión HisTGF α -P64K.

- 5 Se cultivaron bacterias de E. coli (cepa MM299) que expresan la proteína de fusión HisTGF α -P64K en medio de cultivo LBA (Tryptona 10 g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y 50 mg/L de ampicilina) por 10 horas a 37°C. Después de la recolección de las células, todos los pasos fueron realizados de 0-4°C. La ruptura de la bacteria se realiza utilizando una prensa francesa a 1500 kg/cm², y se remueve la fracción insoluble
- 10 mediante centrifugación a 11,000xg por 30 minutos. Como primer paso de purificación se lleva a cabo una precipitación al 40% de sulfato de amonio, que remueve algunas de las proteínas contaminantes de E. coli. El precipitado resultante fue removido mediante centrifugación a 11,000 xg, 4°C, por 30 minutos. El sobrenadante fue fraccionado mediante cromatografía de interacciones de afinidad por quelatos metálicos (Chelating
- 15 Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Sweeden), debido a la presencia de seis histidinas en la proteína, con un gradiente creciente de Imidazol de 25 mM a 500 mM en tampón Tris-Cl, pH= 5.5, que contiene 0.5 M de cloruro de sodio. Seguidamente la muestra resultante se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna G25 (Pharmacia) equilibrada con PBS 1X para eliminar las sales, mostrando un nivel de
- 20 pureza del 95%. La concentración de proteínas se determinó usando el método de Lowry y cols ((1951)J.Biol.Chem. 191, 495-498). La caracterización de la proteína fusionada se llevó a cabo mediante la técnica de "Western Blotting", usando anticuerpos específicos contra P64K y TGF α .

- Ejemplo 6: Reconocimiento de la proteína recombinante TGF α -P64K por un**
- 25 **anticuerpo monoclonal (AcM) específico por el hTGF α .**

Con el objetivo de determinar si el TGF α podía ser reconocido por un AcM anti-hTGF α comercial (Calbiochem) en el contexto de la proteína fusionada, realizamos la técnica de "Western Blotting". Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando 25 μ g de las proteínas EGF-P64K, TGF α -P64K ó P64K por duplicado y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m según los procedimientos convencionales. Después de la transferencia las membranas se incubaron con una solución bloqueadora de TBS 1X mas 5% de leche descremada por toda la noche a 4 °C. Luego de un breve lavado con TBS 1X-Tween 20 (0.05%), las membranas se incubaron , una replica con un anticuerpo anti-P64K (1/ 500) (Fig.3A) y la otra con un AcM anti-TGF α (1/100) (Fig.3B) por dos horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron tres lavados con la misma solución y se incubaron las membranas con un antisuero anti- inmunoglobulinas totales de ratón 1/1000 conjugado con fosfatasa alcalina por una hora en iguales condiciones. Finalmente se le añadió 0.004 g de sustrato Fast Red (Sigma) en tampón Tris-Cl 0.1 M pH=8.2 que contiene 0.004 g de Naphtol AS-MX Fosfato (Sigma) y 400 μ L de NN'Dimetil Formamida en 20 mL. La reacción se detuvo con lavados iguales a los descritos con anterioridad. Se observó un reconocimiento específico del AcM anti-hTGF α por la proteína TGF α -P64K (Fig. 3). Los resultados obtenidos demuestran que el TGF α en la proteína de fusión mantiene una estructura capaz de ser reconocida por un anticuerpo específico.

20 Ejemplo 7: Obtención de un conjugado químico hTGF α -P64K.

Se mezcló un mililitro de TGF α en PBS/MgCl₂ 10 mM a una concentración de 2 mg/mL con un mililitro de P64K a 2 mg/mL en el mismo solvente. Se añadió 0.2 mL de glutaraldehído al 0.5% para una concentración final de 0.05%. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se dializó contra una solución de PBS 1X/MgCl₂ 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realizó una diálisis

contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Ejemplo 8: Obtención de una proteína de fusión entre el hTGF α , hEGF y P64K.

El gen que codifica para el hEGF (150 pb) se amplifica mediante PCR a partir del
5 plásmido pBEF 10 que contiene al hEGF completo clonado en el sitio EcoR V del vector comercial pBluescript SK II (Stragene). El ADN obtenido de esta manera se une al vector pMHisTGF α en un sitio Bam HI que se encuentra en el final del extremo C-terminal de la P64K utilizando la metodología descrita en el ejemplo 2. De esta manera se obtiene el vector pMTGF α -EGF que codifica para la proteína de fusión TE-P64K

10 **Ejemplo 9: Obtención de un conjugado químico hTGF α -hEGF-P64K.**

Se mezcló un mililitro de hTGF α en PBS/MgCl₂ 10 mM a una concentración de 3 mg/mL con un mililitro de hEGF a 3 mg/mL y P64K a 3 mg/mL en el mismo solvente. Se añadió 0.6 mL de glutaraldehído al 0.5% para una concentración final de 0.05%. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se dializó contra una solución de PBS
15 1X/MgCl₂ 10 mM, con tres cambios de la solución de diálisis. Finalmente, se realizó una diálisis contra PBS 1X por toda la noche a 4°C. El preparado inmunogénico se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Ejemplo 10: Preparación de formulaciones que contienen hTGF α .

Los diferentes preparados inmunogénicos descritos en los ejemplos 2, 3, 7, 8 y 9 se
20 mezclaron con Al(OH)₃ ó Montanide ISA 51 según se describe en la descripción detallada de la invención. Se utilizaron cantidades que equivalen a 50 μ g de hTGF α en todos los preparados y 50 μ g de hTGF α y hEGF, en el caso de las vacunas combinadas descritas en los ejemplos 8 y 9. Se utilizó 2mg de Al(OH)₃ por cada preparado de

proteína fusionada o conjugado químico de hTGF α ó hEGF que contiene 50 μ g equivalentes de cada factor de crecimiento respectivamente.

Ejemplo 11: Preparación de una vacuna combinada que contiene la proteína TGF α /P64K y la proteína EGF/P64K.

- 5 Se mezclaron 0.6 mg de cada una proteína, lo que equivale a 50 μ g de cada uno de los dos factores de crecimiento, en un volumen total de 0.5 mL y se unió con igual volumen de Montanide ISA 51 y se agitó 10 minutos a temperatura ambiente antes de la inyección.

En el caso de utilizar Al(OH)₃ como adyuvante, se mezclaron dos preparados vacunales
10 que contienen 0.6 mg de proteína cada una de las proteínas antes mencionadas en 0.5 mL final adsorbidos en 2 mg de Al(OH)₃.

Ejemplo 12: Preparación de una vacuna combinada que contiene un conjugado químico TGF α /P64K y EGF/P64K.

- Se mezcló 0.25 mL de un preparado inmunogénico que contiene 50 μ g de TGF α unido
15 a P64K según lo descrito en el ejemplo 7 con 0.25 mL de un preparado inmunogénico de iguales características que contiene hEGF y se mezcló con 0.5 mL de Montanide ISA 51 según lo descrito en el ejemplo 10, utilizando una jeringuilla, por un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente.

En el caso de utilizar Al(OH)₃ como adyuvante, se mezclaron 0.5 mL de cada uno de los
20 conjugados químicos antes descritos que contenían 50 μ g de hTGF α y hEGF respectivamente adsorbidos en 2 mg de Al(OH)₃.

Ejemplo 13: Inmunogenicidad de la TGF α -P64K / Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide ISA 51) en el modelo murino.

- Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad , ratones de la cepa Balb/c, hembras
25 entre 6-8 semanas fueron inyectados por vía subcutánea con 58 μ g (5 μ g equivalentes

de TGF α), 116 μ g (10 μ g) ó 0,6 mg (50 μ g) de la TGF α -P64K en una proporción 1:1 con Montanide ISA 51. El inmunógeno se preparó según lo descrito en la descripción detallada de la invención agitándose por 10 minutos antes de la inmunización. Cada animal recibió 4 dosis quincenales. Se realizaron extracciones de sangre previo a la
5 primera dosis, una semana después y cada dos semanas a partir de ese momento. El suero se separó de la sangre extraída de los animales y se determinó el título de anticuerpos específicos contra el hTGF mediante la técnica de ELISA indirecto.

Brevemente, las placas de ELISA (Costar) fueron recubiertas con 50 μ L/pozo de una solución de hTGF α a 2.5 μ g/mL en tampón carbonato pH= 7.2 é incubadas toda la
10 noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS 1X-Tween 20 (0.05%), las placas se bloquearon con una solución de PBS 1X-Tween 20 (0.05%)-SFT (5%) por 1 hora a 37°C. Inmediatamente se añadieron los sueros de los ratones inmunizados, y se incubaron por 2 horas a 37°C. Luego de lavar las placas nuevamente, se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-Inmunoglobulinas totales de ratón conjugado con fosfatasa
15 alcalina (Sigma) diluido 1/1000 en PBS 1X-Tween 20 (0.05%)-SFT (5%) (50 μ L /pozo) por 1 hora a igual temperatura. Finalmente, luego de volver a lavar las placas de la misma manera, se añadió el sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato(Sigma)) a una concentración de 1 mg/mL en tampón Dietanolamina pH=9.8 (50 μ L /pozo). La absorbancia del complejo enzima-sustrato formado se midió en un lector de ELISA a
20 405 nm.

En la figura 4 se observa la cinética de la respuesta polivalente de anticuerpos anti-hTGF α obtenida en ratones inmunizados con la TGF α -P64K.

Debido a la alta homología entre el hTGF α y el de rata ó ratón (93%) se puede considerar que la respuesta generada contra el hTGF α como una respuesta contra el TGF α antólogo.

Ejemplo 14: Inmunogenicidad de la TGF α -P64K / Al(OH) $_3$ en el modelo murino.

- 5 Se realizó un protocolo de inmunización según lo descrito en el ejemplo anterior, utilizando 2 mg Al(OH) $_3$ como adyuvante. El inmunógeno se preparó según lo descrito en la descripción detallada de la invención . Se obtuvieron títulos de anticuerpos específicos por TGF α de hasta 1/10000. La técnica utilizada para determinar el título de anticuerpos anti-TGF α fue la de ELISA indirecto descrita en el ejemplo 13.

- 10 **Ejemplo 15: Distribución de las subclases de inmunoglobulinas de isotipo IgG en los ratones inmunizados con la proteína TGF α -P64K / Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide ISA 51) en el modelo murino.**

- Se determinó la distribución de subclases IgG obtenida mediante la técnica de ELISA indirecto descrita en el ejemplo 13, utilizando antisueros específicos contra la diferentes subclases de IgG murino conjugados con biotina (Jackson) a una dilución de 1/1000 y posteriormente el complejo estreptavidina-fosfatasa (1/1000).

- Se determinó la proporción de cada una de las subclases de IgG con respecto a la IgG total en el suero de los animales inmunizados con 50 μ g de TGF α en la proteína fusionada usando la vía subcutánea (Grupo 1) o intramuscular (Grupo 2) siguiendo el protocolo de inmunización descrito en el ejemplo 13. En la figura 5 se observa la distribución de subclases obtenida. Se obtuvo una mayor proporción de IgG1 en los dos grupos de ratones utilizados en el estudio.

Ejemplo 16: Determinación de la capacidad de los sueros de los animales Inmunizados con la proteína TGF α -P64K / Adyuvante Incompleto de Freund

(Montanide ISA 51) de inhibir la unión del $\text{TGF}\alpha\text{-I}^{125}$ mediante la técnica de "radio receptor assay"(RRA).

Con el objetivo de determinar si los anticuerpos generados en los protocolos de inmunización descritos anteriormente eran capaces de inhibir la unión del $\text{TGF}\alpha$ a su receptor , se realizó un ensayo *in vitro* denominado RRA. En síntesis, los sueros de los ratones inmunizados según se describe en el ejemplo 13 se incubaron con una mezcla que incluye 100 μL de membrana de placenta humana y 20 μL de $\text{TGF}\alpha\text{-I}^{125}$ (100000 cpm) y 330 μL de tampón Tris-Cl 10 mM, MgCl_2 10 mM y BSA al 1%, pH=7.4. El marcaje de $\text{TGF}\alpha$ se realizó mediante el método de la cloramina T (Hunter y Greenwood (1962, Nature, 358:495-498). La mezcla se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se detuvo la reacción con 1 mL del tampón antes mencionados. Finalmente se centrifugaron los tubos a 1000 rpm por 30 minutos. Las células sedimentadas se lavaron y dejaron secar. La radioactividad se midió en un contador gamma (Wallac, Finlandia). La caída en los valores de radioactividad medidos indica la inhibición del enlace entre el $\text{TGF}\alpha$ y su receptor, debida a la acción de los sueros ensayados. Se obtuvo un porcentaje de inhibición entre un 50%-80% en todos los sueros ensayados.

Ejemplo 17: Determinación de la respuesta sérica contra el EGF humano (hEGF) generada por la Inmunización con la proteína $\text{TGF}\alpha\text{-P64K}$.

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-EGF en los sueros de los ratones que mostraron altos títulos de anticuerpos anti- $\text{TGF}\alpha$, mediante la técnica de ELISA indirecto previamente descrita. Diluciones de 1/100, 1/1000 y 1/10000 de los sueros se enfrentaron a placas recubiertas con hEGF (CIGB). En la figura 6 se muestran los títulos anti-EGF que mostraron los sueros de los animales inmunizados con la proteína

TGF α -P64K, como se observa se obtiene respuesta de anticuerpos anti-EGF solamente en un grupo de ratones inmunizados.

Sin embargo ratones inmunizados con el conjugado químico EGF-P64K no mostraron ningún nivel de respuesta de anticuerpos anti-TGF α .

5 Ejemplo 18: Reconocimiento de tumores humanos *in vitro* por un antisuero policlonal anti-hTGF α obtenido por la inmunización con la proteína TGF α -P64K / Adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA 51).

Se utilizó los antisueros policlonales anti-hTGF α obtenidos a partir de la inmunización de ratones con la proteína heteróloga TGF α -P64K en Montanide ISA 51 para
 10 determinar la expresión de TGF α en biopsias de tumores incluidas en parafina de pacientes vacunados con la vacuna basada en EGF. En un paciente con alta respuesta de anticuerpos anti-hEGF, se observó una regresión del tumor NSCLC. Sin embargo, después se le detectó un segundo tumor de laringe. Biopsias de estos dos tumores fueron analizadas y se observó una expresión diferencial del EGF y el TGF α en cada
 15 una de ellas. En la figura 7 se muestran los valores de reactividad obtenidos con los diferentes monoclonales utilizados. Estos resultados confirman que mediante la inmunización con el preparado vacunal TGF α -P64K se generan anticuerpos específicos contra el hTGF α capaces de reconocer a esta molécula en tumores humanos.

20 Ejemplo 19: Expresión de EGF (ARNm), TGF α (ARNm) y EGF-R (ARNm) en biopsias de carcinomas de mama

Se extrajo el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de biopsias de tumores de mama utilizando el reactivo TRIZOL (Life technologies) y se convirtió ADNc mediante la enzima reverse transcriptasa. El ADNc total se sometió a 30 ciclos de PCR utilizando cebadores específicos para cada una de estas moléculas. Como control interno se
 25 utilizó un gen de mantenimiento celular presente en todas las células (GAPDH). El

producto de PCR obtenido se separó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se visualizó con bromuro de etidio.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos al utilizar los cebadores específicos para el EGF, TGF α , EGF-R y GAPDH (Control interno) en 22 carcinomas de mama.

- 5 Solamente se observó EGF ARNm en 1/22 biopsias, sin embargo se observó una alta expresión de TGF α y EGF-R en la mayoría de las muestras. La correlación entre estas dos moléculas, sugiere la importancia del lazo autocrino TGF α /EGF-R en el crecimiento de este tipo de tumores (Figura 9).

Breve descripción de las Figuras

- 10 **Figura 1:** Secuencia genética y aminoacídica (letras subrayadas en negrita) del h-TGF α maduro.

Figura 2: Representación esquemática del proceso de obtención del vector de expresión pMTGF α .

- Figura 3:** Reconocimiento de la proteína de fusión TGF α -P64K por anticuerpos monoclonales anti-P64K (A) y anti-hTGF α (B) mediante la técnica de "Western Blotting".
- 15 Se realizó una SDS-PAGE al 10 % de la P64K (1), EGF-P64K (2) y TGF α -P64K (3) y luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa donde se incubaron con anticuerpos específicos contra P64K (A) ó TGF α (B) con el objetivo de caracterizar la proteína fusionada entre el TGF α y la P64K.

- 20 **Figura 4:** Cinética de la respuesta de anticuerpos anti-hTGF α : Los títulos de anticuerpos específicos contra el hTGF α fueron medidos mediante la técnica de ELISA indirecto. Los ratones fueron inmunizados con 5 μ g (A), 10 μ g (B) y 50 μ g (C) de TGF α -equivalente en la proteína TGF α -P64K en Montanide ISA 51. Las abscisas representan los días en que se obtuvieron las muestras de suero de cada ratón individual y las

ordenadas el recíproco de los títulos de anticuerpos alcanzados. Los días de inmunización se señalan con flechas en el gráfico A (Día 0, 14, 28 y 42).

Figura 5: Distribución de subclases de los anticuerpos inducidos a partir de la inmunización con 50 µg de TGFα-equivalente en la proteína fusionada. Comparación de la proporción de subclases de IgG en la respuesta de anticuerpos inducida con la inmunización de la proteína TGFα-P64K por vía subcutánea (1) ó intramuscular (2). Los valores de desviación estándar se muestran en la figura para cada uno de los grupos de 5 animales inmunizados.

Figura 6: Respuesta de anticuerpos específicos por el hEGF en ratones inmunizados con la proteína de fusión TGFα-P64K. En la tabla se muestran los valores del título de anticuerpos anti-TGFα y anti-EGF en ratones inmunizados con TGFα-P64K.

Figura 7: Determinación por métodos inmunohistoquímicos de la presencia de EGF-R, EGF y TGFα en biopsias de tumores de un paciente vacunado incluido en el ensayo clínico piloto II de vacuna EGF. La reactividad diferencial de estas tres moléculas en el tumor primario de pulmón y de un segundo tumor primario de laringe que apareció con posterioridad, se muestran con signos positivos en la figura.

Figura 8: Expresión de ARNm de EGF, TGFα y EGF-R en 22 carcinomas de mama. En la figura se muestran los productos de 30 ciclos PCR obtenidos con los cebadores específicos para cada molécula y visualizados con bromuro de etidio después de ser separados en geles de agarosa al 1.5%. También se observa la expresión de ARNm de GAPDH utilizado como control interno.

Figura 9: Correlación entre los niveles de TGFα ARNm y EGF-R ARNm en biopsias de carcinoma de mama: La intensidad de las bandas obtenidas con bromuro de etidio se analizó mediante un programa de computación (ImagQuant, Amersham) . El eje de las x muestra los valores de intensidad para los productos de PCR utilizando cebadores

específicos para EGF-R entre los obtenidos con GAPDH, para cada una de las muestras y el eje de las y muestra los mismo pero para el TGF α . Se observó una correlación positiva entre la expresión de las dos moléculas, $R^2= 0.657$, $p=0.00121$.

REIVINDICACIONES

- 1- Una composición vacunal capaz de producir una respuesta inmune específica contra el TGF α autólogo, caracterizada porque comprende como principio activo TGF α autólogo o cualquier derivado del mismo y un adyuvante apropiado.
- 2- Una composición vacunal según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende TGF α humano recombinante.
- 3- Una composición vacunal capaz según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizada porque emplea como principio activo TGF α autólogo solo o en combinación con otros ligandos del EGF-R.
- 4- Una composición vacunal capaz según las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizada porque el TGF α autólogo y los ligandos del EGF-R que se emplean como principios activos, pueden ser opcionalmente enlazados a una proteína transportadora, tanto por conjugación química como genéticamente.
- 5- Una composición vacunal según la reivindicación 4, caracterizada porque comprende la proteína P64K de *Neisseria meningitidis* como proteína transportadora.
- 6- Una composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque comprende como principio activo un conjugado químico entre TGF α y P64K de *Neisseria meningitidis*.
- 7- Una composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque comprende como principio activo un conjugado químico entre el TGF α y la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*, y adicionalmente EGF.
- 8- Una composición vacunal según la reivindicación 5, caracterizada porque comprende como principio activo una proteína de fusión recombinante entre el TGF α y la proteína P64K de *Neisseria meningitidis*.

- 9- Una composición vacunal según la reivindicación 8, caracterizada porque comprende una proteína de fusión recombinante entre el TGF α y la P64K de *Neisseria meningitidis*, la cual presenta una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal de dicha proteína P64K.
- 5 10- Una composición vacunal según reivindicación 9 caracterizada porque comprende como principio activo una proteína de fusión recombinante entre el TGF α , la proteína P64K de *Neisseria meningitidis* y el EGF.
- 11- Una composición vacunal según las reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque comprende Adyuvante Incompleto de Freund como adyuvante.
- 10 12- Una composición vacunal según la reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque comprende Al(OH)₃ como adyuvante.
- 13- Método para el control del crecimiento y/o proliferación celular en tumores de origen epitelial que expresan TGF α y otros ligandos del EGF-R, caracterizado porque se emplea la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12.
- 15 Método según la reivindicación 13 para el tratamiento de tumores como carcinomas epidermoides de pulmón, mama, próstata, gástrico, y de ovario caracterizado porque se emplea la composición vacunal de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12.

RESUMEN

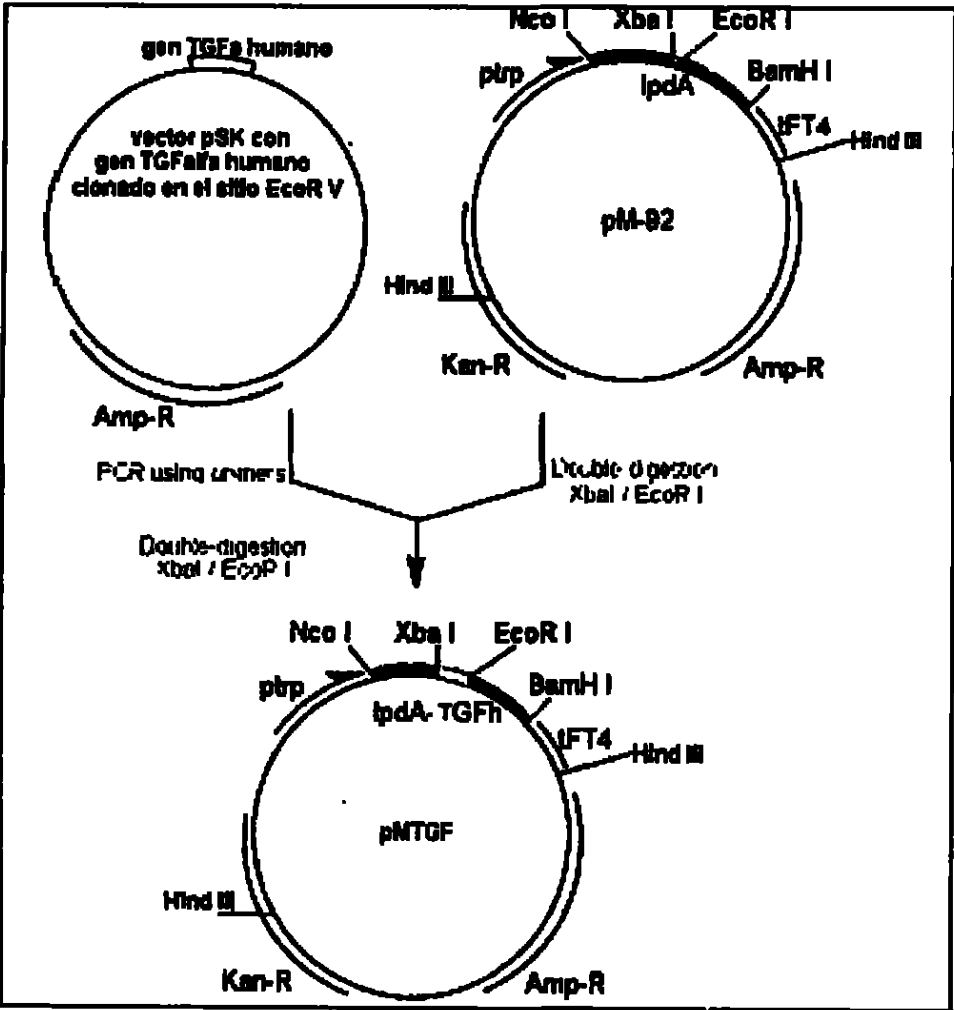
La presente invención está relacionada con el campo de la inmunología y la medicina humana, en particular con la inmunoterapia activa específica de tumores malignos dependientes del $TGF\alpha$ para su crecimiento, así como para el tratamiento de otras
5 enfermedades que dependan del $TGF\alpha$, mediante un preparado vacunal capaz de provocar una reacción de inmunocastración del $TGF\alpha$ autólogo.

Otro objeto importante de esta invención es la obtención de un preparado vacunal que incluya una combinación del $TGF\alpha$ con otros ligandos del EGF-R, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), capaz de inhibir la proliferación de tumores cuya
10 progresión dependen de estos factores de crecimiento. De esta manera se evita la resistencia que puede generar el tumor a vacunas que contenga cada uno de estas moléculas por separado.

Figura 1

1-V V S H⁺ F N D⁻ C₂ P₂ D⁻ S H⁺ T O F
GTG-GTG-TCC-CAT-TTT-AAT-GAC-TOC-CCA-GAT-TCC-CAC-ACT-CAO-TTC-
C₁₄ F H⁺ G T C₁₁ R⁺ F L V O E D⁻ K⁺ P₂₀
TGC-TTC-CAT-GGA-ACC-TGC-AGG-TTT-TTG-GTG-CAG-GAG-GAC-AAG-CCA-
A C₂₃ V C₁₄ H⁺ S G Y V G A R⁺ C₂ E H⁺
GCA-TGT-GTC-TGC-CAT-TCT-GGG-TAG-GTT-GGT-OCA-CGC-TGT-GAG-CAT-
A D L L A -30
GCC-GAC-CTC-CTG-GCC.

Figura 2



2/5

Figura 3

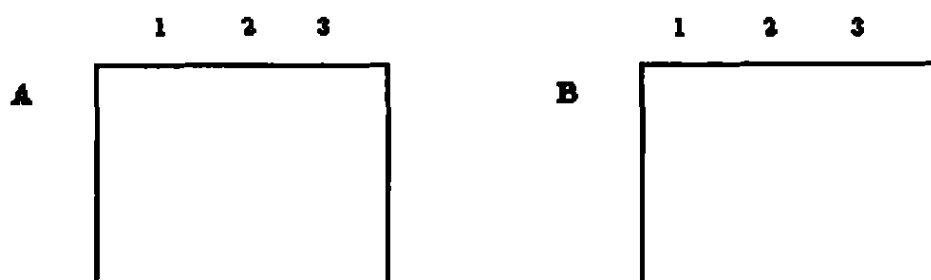


Figura 4

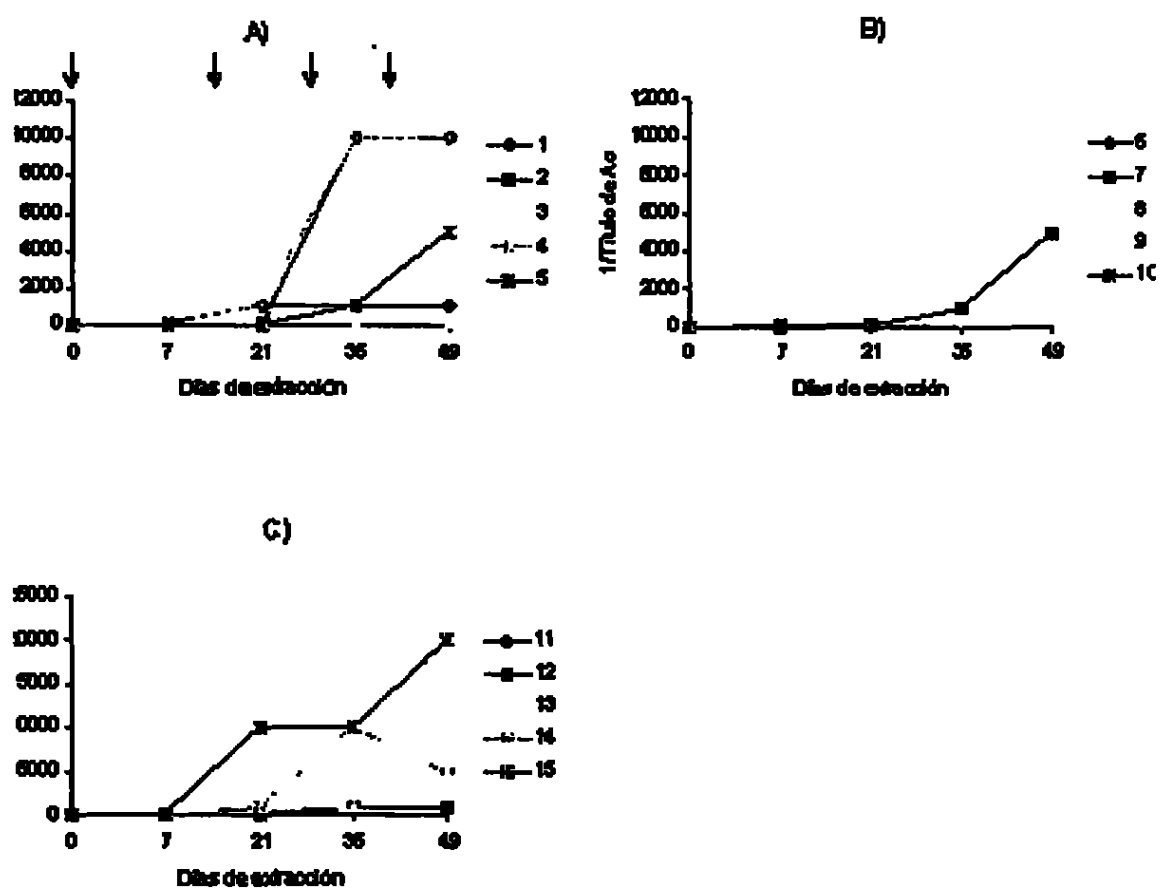


Figura 5

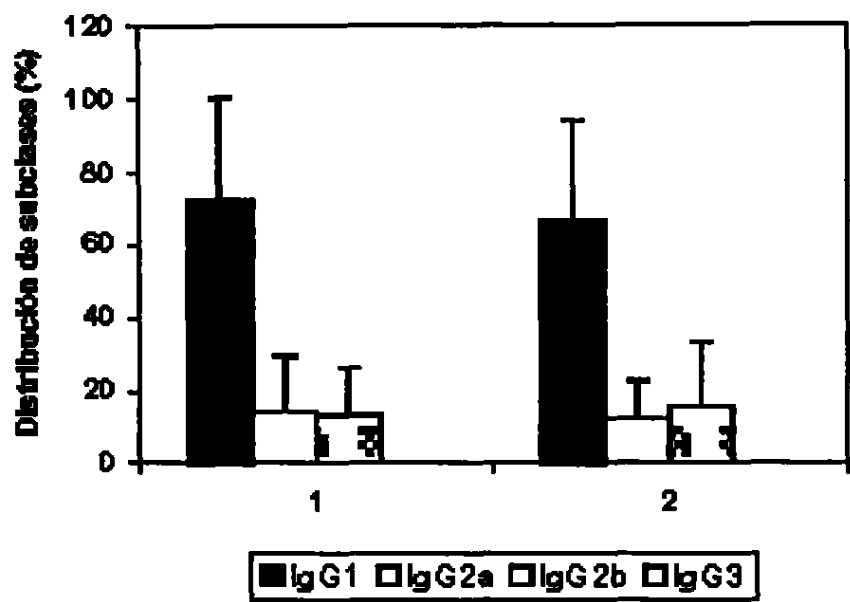


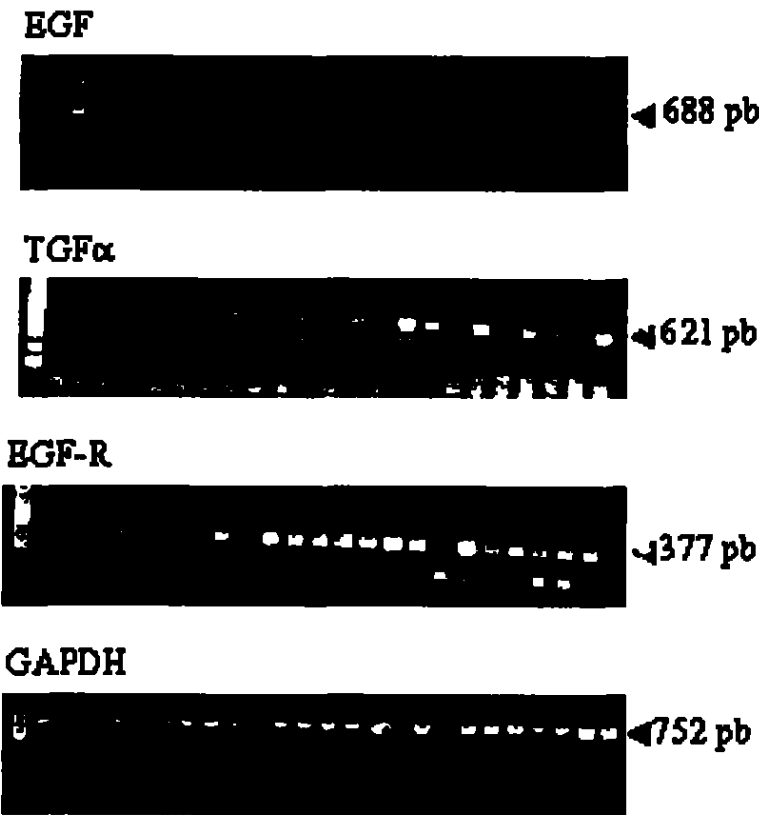
Figura 6

Ratón	1/Título TGFα	1/Título EGF
1	10000	5000
2	10000	100
3	10000	5000
4	10000	1000
5	20000	1000
6	10000	5000
7	10000	5000
8	10000	1000
9	10000	100
10	10000	100
11	10000	100
12	10000	100

Figura 7

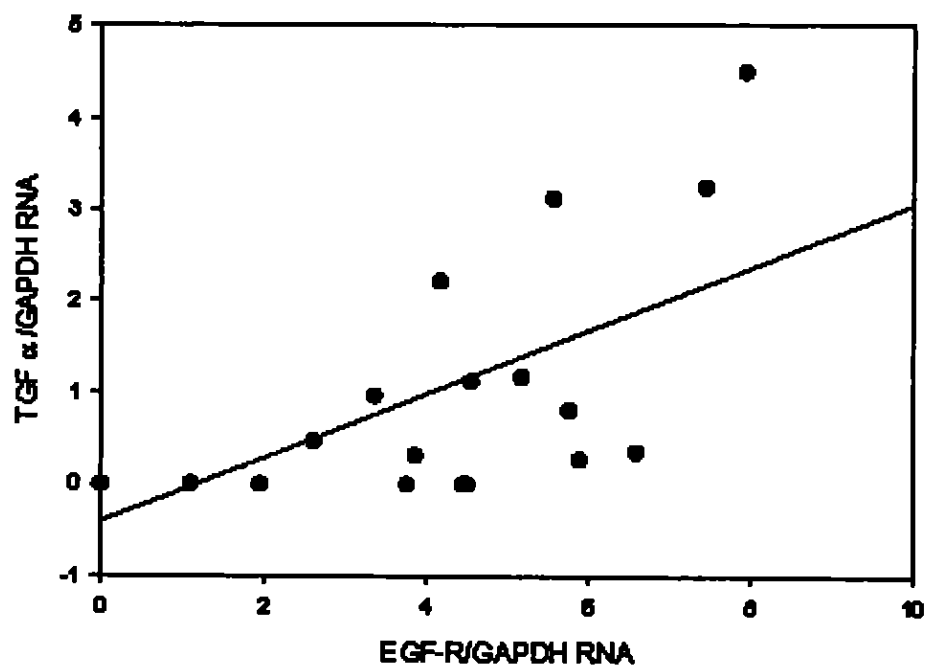
	Pulmón	Laringe
EGF-R	+++	+++
EGF	+++	+
TGF α	+	+++

Figura 8



5/5

Figura 9



4874 68

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT/TGF	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA418)	
International application No. PCT/CU01/00011	International filing date (day/month/year) 06/12/2001	Priority date (day/month/year) 06/12/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K38/18		
Applicant CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, et al.		
1. This International preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 1 sheets.		
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☐ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 02/07/2002	Date of completion of this report 24.03.2003	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 apmu d Fax: +49 89 2369 - 4465	Authorized officer Didelon, F Telephone No. +49 89 2369 7332 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REP RT**

International application No. PCT/CU01/00011

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the International application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, pages:

1-14 as originally filed

Claims, No.:

1-8 with telefax of 05/02/2003

Drawings, sheets:

1/5-5/5 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the International application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the International search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the International application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of International preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application, the International preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the International application in written form.
- ☐ filed together with the International application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the International application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages:

☐ the claims, Nos.:

Section V:

1. The amendments filed with the telefax dated 05.02.2003 are acknowledged and are found to meet the requirements of Article 34(2)(b) PCT.
2. The present claim 1 is directed to a vaccine composition composed of a fusion protein between a carrier protein and TGF-alpha (or peptide derived from it) and an adjuvant.

2.1 Novelty:

Present claims 1-6 are found to be novel (Article 33(1) PCT) in view of the cited prior art, since none of these documents describe a fusion protein between a carrier protein and TGF-alpha, and an adjuvant, which together form a vaccine composition.

D1 (GB-A-2 333 706) describes a vaccine with GDF-8 or myostatin which can be made, in addition to the classical conjugation, of a fusion protein. TGF-alpha however is not envisaged as the antigen for eliciting an immune response.

D2 (WO 91 01146 A) relates to immunogenic conjugates which can be made by genetic fusion between an antigen (bound with a carbohydrate) and a cytokine. However, no TGF-alpha is mentioned but vaguely to tissue growth factor.

D3 (US-A-5 894 018) discloses a vaccine under the same fusion principle, but with EGF.

2.2 Inventive step:

The principle underlying the present invention is the fusion between a carrier protein and a cytokine - TGF-alpha - for making a vaccine. The antigenicity of the antigen is influenced by the structure under which it is presented to the immune system. In the case of a fusion, the antigenicity will be different from, e.g., the same antigen in a

conjugated form as often found in the art.

The closest document in that respect is D3 disclosing a vaccine made from the fusion of EGF and a carrier like P64k of *Neisseria meningitidis* (see example 14), and an adjuvant for making an anti-cancer vaccine.

Document D4 (D'ERRICO A ET AL.: 'Role and new perspectives of transforming growth factor-alpha (TGF- α) adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction.' BR J CANCER, vol. 82 (4), February 2000 (2000-02), pages 865-870, XP002210096) is describing the strong expression of TGF-alpha in adenocarcinomas and its biological effect on tumor progression (see page 869).

Since both EGF and TGF-alpha are ligands of the EGF-R, and that D3 provides an efficacious vaccine the skilled person would be prompted to use TGF-alpha instead of EGF for making a vaccine against cancers where a strong increase in TGF-alpha expression is found.

The use of the strategy of D3 and the mere change of antigen with respect to D3 seems to be obvious when faced to the problem of treating TGF-alpha related cancers.

Consequently, claims 1-6 lack an inventive step according to Article 33(2) PCT.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CU01/00011

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims 1-6
	No:	Claims
Inventive step (IS)	Yes:	Claims
	No:	Claims 1-6
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims 1-6
	No:	Claims

2. Citations and explanations
see separate sheet



SERVICIOS
JURIDICOS
LEX S.A.
MARCAS Y
PATENTES

CLAIMS

1. A vaccine composition to elicit an immune response against autologous TGF- α , which comprises as active principle a fusion protein between a carrier protein and human TGF- α or any peptidic derivative of the same, alone or in combination with any EGF-R ligand and additionally comprising an adjuvant, wherein said fusion protein is able to elicit said immune response against TGF- α .
2. The vaccine composition according to claim 1 wherein the carrier protein is the protein P641: from the outer membrane protein complex of *Neisseria meningitidis*.
3. The vaccine composition according to claim 2 wherein the carrier protein contains a tail of six histidines in the N-terminal end.
4. The vaccine composition according to claim 1 wherein the EGF ligand is EGF.
5. The vaccine composition according to claim 1 wherein the adjuvant is Incomplete Freund Adjuvant.
6. The vaccine composition according to claim 1 wherein the adjuvant is $Al(CH_3)_3$.

LA HABANA 4, CUBA
C.P. 10400
APARTADO POSTAL 4212
TEL.: (537) 204 9093
FAX (537) 204 9833
TUX 81 1732 CAM-45-CU
ADDRESS:
1001, 1st AVENUE AND 10,
MINIMAL PLAZA,
HAVANA, CUBA
e-mail: lex@tele-nba.cu

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 38 y Regla 70 del PCT)

Archivo de referencia del solicitante o del agente PCT/TGF	PARA ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión del Informe del Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/1PEA/416)
Solicitud Internacional No. PCT/CU01/00011	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) Diciembre 8, 2001 (08/12/2001)	Fecha de prioridad (día/mes/año) Diciembre 8, 2000 (08/12/2000)
Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP A61K38/18		
Solicitante: CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, et al.		
1 Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo con el Artículo 38. 2 Este INFORME consiste en un total de <u>5</u> hojas, incluyendo esta carátula. ☒ Este informe también se acompaña de los ANEXOS, esto es, hojas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido reformados y son la base de este informe y/o hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT Estos anexos consisten en un total de <u>1</u> hojas.		
3 Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítem: I ☒ Base del Informe II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, altura inventiva y aplicación industrial IV ☐ Carencia de unidad de la invención V ☒ Declaración razonada según artículo 35(2) con relación a la novedad, altura inventiva o aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		

Fecha de presentación de la demanda 2 de Julio de 2002 (02/07/2002)	Fecha de completamiento de este informe 24 de Marzo de 2003 (24/03/2003)
Nombre y dirección de correo del IPEA/JP European Patent Office D-80298 Munich Tel.: +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax.: +49 89 2369 - 4485	Funcionario autorizado Didelon, F Teléfono No. 49 89 2369 7332

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/CU01/00011

I. Base del Informe

1 Con relación a los elementos de la solicitud internacional (las páginas reemplazadas que han sido presentadas a la oficina receptora en respuesta a la invitación con respecto al Art. 14 están referidas en este informe "originalmente presentadas" y no se anexan a este informe ya que estas no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, páginas:

1 - 14 como se presentó originalmente

Reivindicaciones Nos.:

1 - 6 con el fax de 5/2/03

Dibujos, páginas:

1/5 - 5/5 como se presentó originalmente

2 Con relación al idioma, todos los elementos antes marcados se pusieron a disposición y se suministraron a esta autoridad en el idioma en el que se presentó la solicitud internacional, a menos que se indique de otra forma en este punto.

Estos elementos se pusieron a disposición o se suministraron a esta autoridad en el siguiente idioma el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para fines de investigación internacional (según la Regla 23.1(b)).
- ☐ el idioma de publicación de la solicitud internacional (bajo la Regla 48.3(b)).
- ☐ el idioma de la traducción suministrada para fines de examen preliminar internacional (bajo la Regla 55.2 y/o 55.3)

3 Con relación a cualquier nucleótido y/o secuencia amino ácida descubierta en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo con base en la lista de secuencia:

- ☐ contenida en la solicitud internacional en forma escrita
- ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible en computador
- ☐ suministrado con posterioridad a esta autoridad en forma escrita
- ☐ suministrado luego a esta autoridad en forma legible en computador
- ☐ la declaración que el listado de secuencia escrito suministrado posteriormente no va más allá del descubrimiento en la solicitud internacional que se presentó ha sido suministrada
- ☐ la declaración que la información grabada en forma legible en computador. es idéntica a la lista de secuencia escrita ha sido suministrada

4 Las reformas han dado como resultado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
PAGINA ANEXA

Solicitud Internacional No.
PCT/CU01/00011

Sección V:

- 1 Las modificaciones presentadas con el fax de fecha 05-02-2003 se recibieron y se encontró que cumplen con los requisitos del artículo 34(2) (b) PCT.
- 2 La presente reivindicación 1 se dirige a una composición vacunal que comprende una proteína de fusión entre un portador de proteína y el TGF-alfa (o un derivado de péptido de este) y un coadyuvante.

2.1 Novedad:

Se encuentra que las presentes reivindicaciones 1 a 6 son novedosas con relación a la técnica anterior (Artículo 33(1) PCT), ya que ninguno de los documentos describen una proteína de fusión entre un portador de proteína y el TGF-alfa, y un coadyuvante, que forman juntos una composición vacunal.

D1 (GB-A-2 333 708) describe una vacuna con GDF-8 o mioestatin que puede fabricarse, además de la conjugación clásica, de una proteína de fusión. Sin embargo, TGF-alfa no se prevé como el antígeno para una respuesta fomentada inmune.

D2 (WO 9101148 A) conserva a los conjugados inmunogénicos que pueden fabricarse por fusión genética entre un antígeno (enlace con un carbohidrato) y una citoquina. Sin embargo, no se menciona un TGF-alfa sino vagamente al factor de crecimiento tisular.

D3 (US-A-5 894 018) revela una vacuna con el mismo principio de fusión, pero con EGF.

2.2 Nivel inventivo:

El principio de la presente invención es la fusión entre una proteína portadora y una citoquina - TGF-alfa - para fabricar una vacuna. La antigenicidad del antígeno es influenciada por la estructura por la cual se presenta al sistema inmune. En el caso de una fusión, la antigenicidad será diferente de, ej. el mismo antígeno en forma conjugada con a menudo se encuentra en el arte previo.

En tal respecto el documento más cercano es D3 que revela una vacuna hecha de la fusión de EGF y un portador como el P64k de *Neisseria meningitidis* (ver ejemplo 14) y un coadyuvante para fabricar una vacuna contra el cáncer.

El documento D4 (D'ERRICO A ET AL.: "Desempeño y nuevas perspectivas de transformar el factor de crecimiento alfa (TGF-alfa) adenocarcinoma de la unión gastroesofágica". BR JCANCER, vol. 82 (4), Febrero 2000 (2000-02), páginas 865-870, XP002210098, describe ampliamente la expresión de alfa TGF en adenocarcinomas y su efecto biológico sobre el tumor de progresión (ver página 869).

Teniendo en cuenta que ambos EGF y TGF alfa son ligandos del EGF-R, y que D3 suministra una vacuna eficaz, una persona normalmente versada en el arte, fácilmente utilizaría TGF-alfa en vez de EGF para fabricar una vacuna contra el cáncer donde se encuentra ampliamente la expresión del TGF-alfa.

El uso de la estrategia del documento D3 y el mero cambio de antígeno con respecto al D3 muestra ser obvio cuando enfrenta el problema de tratar el TGF-alfa relacionado con el cáncer. Por lo tanto, las reivindicaciones 1 a 6 carecen de nivel inventivo de acuerdo al artículo 33 (2) del PCT.

**MODIFICACION DE LAS REIVINDICACIONES
DE CONFORMIDAD CON EL ARTICULO
39(1) DEL PCT**

REIVINDICACIONES

- 1 – Una composición vacunal para provocar una respuesta contra TGF α autologous, caracterizada porque comprende como principio activo una proteína de fusión entre una proteína transportadora y el TGF α humano o cualquier péptido derivado del mismo, junto o en combinación con un ligando EGF-R, y que comprende adicionalmente un adyuvante, donde dicha proteína de fusión es capaz de provocar dicha respuesta inmune contra TGF α .
- 2 – La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada porque la proteína portadora es la proteína P64K obtenida a partir de l Complejo Proteico de la Membrana Externa (OMPC) de *Neisseria meningitidis*.
- 3 – La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 2 caracterizada porque la proteína portadora contiene una cola de seis histidinas en le extremo N-terminal.
- 4 – La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada porque el ligando del EGF-R es el EGF.
- 5 – La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada porque el adyuvante es adyuvante Incompleto de Freund.
- 6 - La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada porque el adyuvante es Al(OH)₃.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓ MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de 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 ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. () ()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. () ()
- Representación gráfica del esquema de trazado () ()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

Andrés Posse

Fecha: