



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización CSA Ltda

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD



PATENTE DE INVENCION

07-52069

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO Formulaciones Inmunoterapéuticas con
capacidad neutralizante de la interleucina-2

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL 207K 14/55 A61K

71. SOLICITANTE Centro de inmunología Molecular

DOMICILIO La Habana, Cuba

74. APODERADO Dilia María Rodríguez D'Almeida

22. BOGOTÁ, D. C., Mayo 24/07

93/

(FORMA P-10)

Formulario 4 folios (25-04-2007)

Nº 100

5



FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capitulo I.		☒ Capitulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Dirección: Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa., Ciudad de La Habana, C.D. 160, Ciudad de La Habana 12100 Cuba Nacionalidad o domicilio: Habana, Cuba Lugar de constitución: Cuba		
Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____			
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
	Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. MONTERO CASIMIRO, Jorge Enrique; 2. ALONSO SARDUY, Liván Bladimir; 3. PEREZ RODRÍGUEZ, Rolando; 4. LAGA DAVILA, Agustín Bienvenido Dirección: 1. Calle 134 Nr. 2916 entre 29 y 31. Juan de Dios Fraga, La Lisa, Ciudad Habana 17100, Cuba; 2. Chamarro #370% Arroyo y Puerta Cerrada, Habana Vieja, Ciudad de La Habana 10200, Cuba; 3. Juan Delgado # 567 entre Ave. Acosta y O'farril, 10 de Octubre., Ciudad de La Habana 10500, Cuba; 4. Coolí No. 51 entre 28 y 30, Vedado, Plaza, Ciudad de La Habana 10600, Cuba Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, La Habana, Cuba		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/CU2005/000009 Fecha: Nov 16, 2005 Publicación Internacional No. WO2006/053508 A1 Fecha: MAYO 26 DE 2006			
6) Título (54) FORMULACIONES INMUNOTERAPÉUTICAS CON CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LA INTERLEUCINA-2			
7) Clasificación Internacional: C07K 14/55 <i>Ver folio 5</i>			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	CUBA	Oct. 16, 2003 <i>Nov 16</i>	261-2004
9) Comprobante de pago N°.			

3 2

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 - 1. Reporte internacional de búsqueda

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

3

12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-052069- -00000-0000

Fecha: 2007-05-24 16:03:10 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 36

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 30,905
FECHA : ABRIL 17 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CD. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63069557	17/04/2007	22,930,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



PCT



(43) Fecha de publicación internacional
26 de Mayo de 2006 (26.05.2006)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/053508 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/55 (2006.01)

Agustín Bienvenido [CU/CU]; Kohly No. 51 entre 28 y
30, Vedado, Plaza, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2005/000009

(74) Mandatario: VAZQUEZ D'ALVARE, Danice; Ave. 1ra
#1001 Esq. a 10, Miramar, Ciudad de La Habana 11300
(CU).

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de Noviembre de 2005 (16.11.2005)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
261-2004
16 de Noviembre de 2004 (16.11.2004) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INMUNOLGÍA MOLECULAR
[CU/CU]; Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, Ciudad de la
Habana, C.D. 160, Ciudad de La Habana 12100 (CU).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MON-
TERO CASIMIRO, José Enrique [CU/CU]; Calle 314
No. 2916 entre 29 y 31, Juan de Dios Fraga, La Lisa,
Ciudad de la Habana 17 100 (CU). ALONSO SARDUY,
Líván Bladimir [CU/CU]; Chamarro # 370 % Arroyo
y Puerta Cerrada, Habana Vieja, Ciudad de La Habana
10200 (CU). PEREZ RODRIGUEZ, Rolando [CU/CU];
Juan Delgado #567 entre Ave Acosta y O'farrill, 10 de
Oct., Ciudad de La Habana 10500 (CU). LAGE DAVILA,

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: IMMUNOTHERAPEUTIC FORMULATIONS WITH INTERLEUKIN-2-NEUTRALISING CAPACITY

(54) Título: FORMULACIONES INMUNOTERAPEUTICAS CON CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LA INTERLEU-
CINA-2.

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutical formulations which can be used in relation to cancer and which block the binding of Interleukin 2 (IL-2) to the receptor thereof. More specifically, the invention relates to therapeutic formulations that can increase the immunogenicity of IL-2 by coupling same to transport protein P64k of Neisseria meningitidis in adjuvant Montanide ISA 51 for the induction of autoantibodies that block the binding of IL-2 to the receptor thereof. The invention also relates to effective methods for the treatment of tumours, including breast cancer. The invention further relates to the therapeutic combination of the IL-2-based vaccine with other cancer vaccines based on specific antigens of tumours or tumour growth factors, as well as radiotherapy or chemotherapeutic medicaments that are traditionally used in oncological practice.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con formulaciones farmacéuticas útiles en el cáncer mediante el bloqueo de la unión de la Interleucina 2 (IL-2) a su receptor. Más particularmente la presente invención se relaciona con formulaciones terapéuticas capaces de incrementar la inmunogenicidad de la IL-2 por su acoplamiento a la proteína transportadora P64k de la Neisseria Meningitidis en adyuvante Montanide ISA 51 para la inducción de autoanticuerpos bloqueadores de la IL-2 a su receptor y métodos efectivos para el tratamiento de tumores, incluyendo el cáncer de mama. En otro aspecto la presente invención se refiere la combinación terapéutica de la vacuna basada en IL-2 con otras vacunas de cáncer basadas en antígenos específicos de tumores o factores de crecimiento tumoral, así como medicamentos quimioterapéuticos o radioterapia de uso convencional en la práctica oncológica.

WO 2006/053508 A1

5

FORMULACIONES INMUNOTERAPEÚTICAS CON CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LA INTERLEUCINA-2.

5 Sector Técnico:

La presente invención se relaciona con formulaciones terapéuticas capaces de incrementar la inmunogenicidad de la Interleucina-2 (IL-2) para la inducción de autoanticuerpos bloqueadores de la IL-2 a su receptor, útiles en el tratamiento de tumores.

10 Técnica Anterior:

El descubrimiento de la capacidad del Sistema Inmune y específicamente de las células T de reconocer antígenos tumorales ha constituido uno de los pilares fundamentales para el desarrollo de estrategias de manipulación del sistema inmune para el tratamiento de pacientes con cáncer.

15 A partir del desarrollo de metodologías para la obtención de células T específicas que infiltran el estroma de los tumores, conocidos como Linfocitos Infiltrantes de Tumores (LIT), o provenientes de sangre periférica provenientes de individuos vírgenes de tratamiento o luego de recibir tratamiento con vacunas de cáncer, el esfuerzo principal ha estado dirigido a la estimulación de dichas células para el incremento de su capacidad efectora antitumoral in vivo.

20 Consecuentemente, las estrategias principales han estado dirigidas al incremento de su actividad citotóxica específica contra una variedad de Antígenos Asociados a Tumores. Fundamentalmente, la línea terapéutica principal ha estado concentrada en el crecimiento in vitro de los LIT en medio que contiene IL-2 (Rosenberg, S. A. et al. (1986) Science 233, 1318-1321; Kawakami, Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-6462; Kawakami, Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3515-3519). Tales intervenciones han resultado en muy limitados resultados clínicos a pesar de lograrse la estimulación de la respuesta inmune celular in vitro .

30 Esto ha conducido a evaluar modalidades terapéuticas basadas en la inmunización activa con vacunas de cáncer con diseño de vectores vacunales que contienen antígenos tumorales e IL-2 con el interés de facilitar la inducción de la respuesta inmune celular efectiva in vivo, aunque sin lograrse los resultados esperados (Rosenberg, S. A., et al. (1998) Nat. Med. 4, 321-327).

Alternativamente, en la actualidad las estrategias clínicas principales han transitado al desarrollo de una modalidad basada en la transferencia adoptiva de células T reactivas contra antígenos tumorales provenientes de los propios pacientes las que se estimulan y expanden in vitro por su tratamiento con Anticuerpos Monoclonales (AcM) anti-CD3 e IL-2 y posteriormente se les re-inoculan al paciente, seguido de la administración parenteral de IL-2. Esta aproximación constituye una de las intervenciones actuales principales para el tratamiento de pacientes con cáncer, aunque los resultados terapéuticos continúan siendo discretos (Dudley, M. E., et al. (2002) Science 298, 850-854; Rosenberg, S. A. et al. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A. 101 Suppl 2, 14639-45).

✱ El diseño racional de toda esta estrategia terapéutica se basa en el uso de la Interleucina-2 como molécula imprescindible en la activación celular de la respuesta inmune antitumoral (US 6,060,068 y US 5,830,452). ✱

La base conceptual de la función de la IL-2 en la inmunidad esta basada por experimentos in vitro. Desde su descubrimiento la IL-2 se reconoció por su capacidad de estimular el crecimiento de células T (de ahí su acrónimo de Factor de Crecimiento de Células T), así como la demostración de que la proliferación y función in vitro de células T puede inhibirse por AcM anti-IL-2 o su receptor anti-IL-2R (Smith, KA. Immunol Rev 51:337-357, 1980).

Recientemente ha sido demostrado experimentalmente que los tumores humanos pueden influir en la reducción de la capacidad de respuesta del Sistema Inmune facilitando la generación de células T con capacidad supresora de la inmunidad antitumoral. Estas células han sido caracterizadas en modelos animales y pacientes, y constan de múltiples marcadores de diferenciación, aunque su relevancia varía acorde al modelo en estudio (Bach, J.F. (2003) Nat Rev Immunol 3, 189-198; Chakraborty, N.G., et al. (2004) Hum Immunol 65, 794-802; Markus, Y.M. y Sykes, M. (2004) J Clin Oncol 22, 1136-1151).

El cluster de diferenciación 25 (CD25) constituye la cadena α del receptor de Interleucina 2. Adicionalmente, las cadenas β (CD122) y γ (CD132) conforman estructuralmente el receptor de esa citocina y se expresan constitutivamente en los linfocitos T en reposo y la activación de éstas células induce la síntesis de la cadena α , la formación del receptor heterotrimérico de alta afinidad y la secreción de IL-2. El CD25 se expresa constitutivamente en el 5 – 10 % de los linfocitos T CD4+ y en menos del 1 % de los linfocitos CD8+ periféricos. Estas células son anérgicas y presentan actividad supresora in vitro (Shevach, E.M. (2002) Nat Rev Immunol 2, 389-400).

Recientemente ha sido demostrado que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales anti-CD25 inducen respuesta antitumoral en algunos tumores experimentales, aunque otros se muestran refractarios a tal terapia (Onizuka, S. et al. (1999) Cancer Res 59, 3128-3133).

La capacidad del Sistema Inmune para la inducción de respuesta contra moléculas propias resulta limitada, específicamente para moléculas solubles como los factores de crecimiento. Sin embargo la inmunización activa con estos factores acoplado a una proteína transportadora y emulsionado en adyuvantes permite la inducción de respuesta inmune contra estas moléculas (US 5,984,018). Los autoanticuerpos específicos generados contra la molécula autóloga o heteróloga inhiben la unión a su receptor, bloqueando los mecanismos de proliferación desencadenados por esta unión.

De los resultados anteriores, se acepta como estado del arte que la respuesta antitumoral es dependiente de la presencia de IL-2. Consecuentemente, decidimos caracterizar in vivo el impacto sobre la evolución tumoral de autoanticuerpos anti-IL-2 inducidos por la inmunización activa con IL-2 acoplada a una molécula transportadora en adyuvante.

Sorprendentemente, la inducción de autoanticuerpos bloqueadores de la unión de Interleucina-2 a su receptor promueve la reducción del crecimiento tumoral, incluso en tumores insensibles al efecto antitumoral que se induce por la administración pasiva de anticuerpos monoclonales

7

anti-CD25. Adicionalmente, la presencia de tales autoanticuerpos no afecta la respuesta inmune a vacunas de cáncer en los mismos individuos.

Descripción detallada de la invención:

- 5 La presente invención se relaciona con formulaciones terapéuticas que tienen un efecto en el tratamiento de tumores, para lo cual el papel del Sistema Inmune del individuo es importante. Más particularmente la presente invención comprende la generación de formulaciones inmunoterapéuticas para la inducción de autoanticuerpos bloqueadores de la unión de la Interleucina-2 a su receptor, capaces de inhibir el crecimiento de tumores.
- 10 Es objeto de la presente invención una formulación terapéutica que inhiba la unión de la IL-2 a su receptor, útil en el tratamiento de individuos con cáncer y caracterizada porque dicha formulación comprende IL-2 o péptidos derivados de esta molécula y acoplados a una proteína transportadora, adicionalmente contiene un adyuvante apropiado. Particularmente la formulación terapéutica de la presente invención comprende la proteína transportadora P64k
- 15 derivada de *Nisseria Meningitidis* y el adyuvante es seleccionado del grupo que comprende hidróxido de alúmina y Montanide ISA 51.
- En una representación de la presente invención la formulación terapéutica comprende un conjugado químico entre la IL-2 y la P64k. En otra representación dicha formulación comprende una proteína de fusión entre la IL-2 o péptidos derivados de la misma y la P64k.
- 20 También forma parte de la presente invención una formulación terapéutica que inhiba la unión de la IL-2 a su receptor, útil en el tratamiento de individuos con cáncer y que comprende un anticuerpo monoclonal específico contra la IL-2 humana (hIL-2).
- Es también objeto de la invención un método de tratamiento de un paciente de cáncer que requiere del bloqueo de la unión de la IL-2 a su receptor para desencadenar una respuesta
- 25 inmune adecuada contra el tumor, que comprende la administración de una composición vacunal que contiene IL-2 o anticuerpos contra IL-2.
- En otro aspecto la presente invención se refiere a la combinación terapéutica de la vacuna basada en IL-2 con otras vacunas de cáncer basadas en antígenos específicos de tumores o factores de crecimiento tumoral, así como medicamentos quimioterapéuticos o radioterapia de
- 30 uso convencional en la práctica oncológica.
- El termino "combinación terapéutica" se refiere tanto a una combinación física (ej en forma de mezcla) como a la asociación de dos compuestos como entidades diferentes y separadas (ejemplo en forma de juegos de reactivos) y cuando son usadas en combinación para tratar a un paciente. Así, combinaciones farmacéuticas son aquellas combinaciones útiles en el
- 35 esquema de tratamiento que involucra la administración de dos compuestos, ya sea tanto por asociación física como por dosis independientes administradas al mismo paciente en el curso de la terapia.
- El termino "vacunas de cáncer" se refiere a un agente útil en la inmunoterapia activa de forma tal que provoque en el sujeto sometido a tratamiento una respuesta inmune que reconozca el
- 40 antígeno utilizado en la vacuna y que pueda ser medida.

8

1.- Obtención de una composición inmunogénica.

La composición vacunal de la presente invención contiene como principio activo la interleucina 2 humana recombinante (hIL-2r) acoplada a una proteína transportadora, preferiblemente la proteína derivada del complejo de membrana externa de *Nisseria Meningitidis* P64k (EP 0474313 A2 y US 5,286,484). Adicionalmente esta composición vacunal contiene un adyuvante apropiado.

La composición vacunal de la presente invención utiliza como adyuvante preferiblemente Montanide ISA 51.

El acoplamiento entre la hIL-2r y la proteína transportadora puede ser por conjugación química o por construcción de una proteína de fusión obtenida por técnicas de ingeniería genética.

- Obtención de una composición vacunal que contiene hIL-2r acoplada a la proteína P64k por conjugación química.

Para la obtención de la proteína conjugada entre la hIL-2r y la proteína P64k se mezclan ambos componentes en una proporción que puede variar desde 20:1 hasta 5:1 (moles de hIL-2r por mol de la proteína P64k), preferiblemente 10:1 (moles de hIL-2r por mol de la proteína P64k). A dicha mezcla se le añade glutaraldehído hasta una concentración final que puede estar en el rango entre 0.02 y 0.1 %, preferiblemente 0.5% y se incuba a temperatura ambiente (TA) entre 1-5 horas. Por último se somete a diálisis extensiva contra solución salina tamponada con fosfato (SSTF).

La comprobación de la reacción de conjugación se realiza mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida usando SDS al 10% (Laemmli UK (1970) Nature 277,680-685).

25 - Obtención de una composición vacunal que contiene hIL-2r acoplada a la proteína P64k en forma de proteína de fusión.

El gen que codifica para la IL-2 humana (447 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 *Escherichia coli*, mediante la técnica de "Western Blotting", usando un anticuerpo monoclonal específico contra hIL-2. 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

(9)

cromatográficos. Finalmente, la proteína es filtrada en condición estéril y conservada a -20°C o liofilizada y conservada a 4°C hasta su uso posterior.

- 5 - **Obtención de composiciones vacunales que contienen péptidos derivados de la hIL-2r conjugados químicamente a la proteína P64k o acoplados a la misma en forma de proteína de fusión.**

Péptidos derivados de la secuencia de aminoácidos de la IL-2 obtenidos por síntesis química se pueden acoplar por conjugación química a la proteína P64k, como se describe en US 5,984,018. Alternativamente, la proteína de fusión de péptidos derivados de la hIL-2r y la
10 proteína P64k, se obtiene esencialmente por el mismo método que el descrito en el epígrafe anterior. Ejemplos de estos, son péptidos que estén comprendidos en las regiones señaladas a continuación:

- 1) Péptido $N^{33}-A^{50}$
15 Total de aa: 18
Secuencia: NPKLTRMLTFKFYMPKKA
- 2) Péptido $T^{113}-T^{133}$
Total de aa: 21
20 Secuencia: TIVEFLNRWITFCQSIISTLT

- **Electroforesis del conjugado químico hIL-2r-P64k.**

Se realiza mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida usando SDS al 10% (Laemmli U.K. (1970) Nature 277,680-685). Se aplican 15 µg de muestra por pozo y se tiñe con
25 Coomassie azul.

2.- **Caracterización del efecto producido por la composición vacunal que contiene hIL-2r y la proteína P64k. Estudios pre-clínicos.**

- 30 - **Inmunogenicidad de la composición vacunal.**

Para estudiar la inmunogenicidad en animales de la preparación vacunal de la presente invención se utilizan ratones BALB/c entre 8 y 12 semanas de edad, hembras, de 18-20 g de peso. Durante la realización de los experimentos los animales se mantienen bajo condiciones de alimentación y manipulación establecidas en los Procedimientos Normalizados de operación
35 (PNO), según la Buenas Prácticas de Cuidado y uso de los Animales de Experimentación (ICLAS).

Se pueden seguir diferentes esquemas de inmunización:

2
10

- Esquema A se inmuniza con la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 cuatro dosis de 4 µg equivalentes de hIL-2r conjugada en el preparado vacunal en un volumen de 0.1 mL, administradas por vía intramuscular cada dos semanas, alternando la zona de administración por las cuatro patas.

5

- Esquema B se inmuniza con la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 cuatro dosis de 10 µg equivalentes de hIL-2r conjugada en el preparado vacunal en un volumen de 0.1 mL, por vía intramuscular, las dos primeras dosis se administran el mismo día alternado la zona de administración en las patas posteriores y a las dos semanas se administran dos dosis alternando la zona de administración en las patas anteriores.

10

- Medición de la respuesta de anticuerpos contra la hIL-2r inducidos por la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.

Los títulos de autoanticuerpos bloqueadores pueden ser detectados en suero por cualquiera de los métodos disponibles en el estado del arte para la medición de autoanticuerpos o por detección de la respuesta inmune específica en sangre periférica, tanto por medición de anticuerpos específicos como por medición de células B específicas.

15

Los anticuerpos contra la hIL-2r inducidos por la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 se pueden determinar empleando la técnica de ELISA (Ensayos Inmunoenzimáticos indirectos en fase sólida) indirecto utilizando los sueros procedentes de los animales sometidos a inmunización. Según se describe: las placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano (Costar, High Binding, USA) se recubren con 50 µL/pozo del hIL-2r, preparado a una concentración de 10 µg/mL en solución tampón carbonato-bicarbonato 0.1M, pH 9.6. Las placas se incuban toda la noche a 4°C, y luego se lavan 2 veces con 200 µL/pozo de PBS (Solución salina tamponada de fosfato) conteniendo 0.05 % de Tween 20 (SSFT-Tween 20). Después de incubar 1 hora a 37°C con 100 µL/pozo conteniendo 1 % de seroalbúmina bovina (SSFT-SAB 1 %), se lavan las placas con 200 µL/pozo de SSFT-Tween 20 y luego se les añaden a las placas 50 µL/pozo de las muestras de suero a diferentes diluciones en SSFT-SAB 1 %. Las placas se incuban 1 hora a 37 °C, posteriormente se lavan con SSFT-Tween 20 y se les añaden 50 µL/pozo de un suero de carnero anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch Laboratories) diluido 1/5000 en SSFT-SAB, incubándose 1 hora a 37°C. Luego de un nuevo lavado, se adicionan 50 µL/pozo de la solución sustrato, consistente en 1 mg/mL de p-nitrofenilfosfato (Sigma) en solución tampón dietanolamina, pH 9.8. La absorbancia del producto de la reacción se mide después de incubar las placas 30 minutos a temperatura ambiente (TA), en un lector de ELISA (Organon Teknika, Austria) a 405 nm.

20

25

30

35

- Medición de la respuesta de anticuerpos contra la hEGF inducidos por una vacuna basada en EGF.

Los títulos de autoanticuerpos bloqueadores pueden ser detectados en suero por cualquiera de los métodos disponibles en el estado del arte para la medición de autoanticuerpos o por
5 detección de la respuesta inmune específica en sangre periférica, tanto por medición de anticuerpos específicos como por medición de células B específicas.

Los anticuerpos contra la hEGF inducidos por una vacuna basada en EGF se pueden determinar empleando la técnica de ELISA (Ensayos Inmunoenzimáticos indirectos en fase sólida) indirecto utilizando los sueros procedentes de los animales sometidos a inmunización,
10 según se describe en Gonzalez, G., et al. (2002) Vaccine Research 5, 233-244.

● - Efecto sobre la proliferación de la línea CTLL-2 tratada con suero de animales vacunados con hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 o con un Anticuerpo Monoclonal (AcM) específico a la hIL-2r.

15 Las células CTLL-2 dependientes de IL-2 se mantienen en continua proliferación en RPMI-1640 conteniendo 1U/mL de hIL-2h. El cultivo de la línea CTLL-2 se realiza en frascos de 75 cm² en 25 mL de RPMI-1640 con Suero Fetal de Ternera (SFT) del 8 al 20 %, a una densidad entre 0.5x10⁵ -10⁶ células por mililitro en suspensión. Las células son usadas dos días después de expandidas.

20 Para realizar el ensayo se extraen las células, se lavan no menos de cuatro veces con RPMI-1640 o SSFT. Se agregan 5x10³ células en cada pozo de la placa de micro titulación de 96 pozos de fondo plano (Costar, High Binding, USA). Estas células son tratadas con suero de animales que han sido inmunizados con la vacuna hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 y cuyos títulos sean de 1:10 000 contra la IL-2, o con un AcM específico contra IL-2. Además se añade 1U/mL
25 de hIL-2r. La placa se incuba por 24 horas en un ambiente húmedo a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Posteriormente se agregan 1 µL de timidina por pozo y se incuba de 18 a 24 horas. Luego se lleva a cabo la medición de la incorporación de timidina con un contador de centelleo líquido. Toda la manipulación se realiza en un ambiente estéril.

30 3- Efecto antitumoral de la composición vacunal hIL-2-P64k/Montanide ISA 51. Estudios pre-clínicos.

Para estudiar el efecto antitumoral en animales de la preparación vacunal de la presente invención se utilizan ratones BALB/c entre 8 y 12 semanas de edad, hembras, de 18-20 g de peso. Los animales pueden ser vacunados con la vacuna hIL-2-P64k/Montanide ISA 51 según
35 los esquemas A y B detallados anteriormente y una semana después de la inmunización se les inoculan 5x10⁴ células del tumor F3II por vía subcutánea en la mama. Se miden periódicamente los diámetros mayor y menor de los tumores.

Sorprendente e inesperadamente los autores de la presente invención han encontrado que el bloqueo de la unión de la IL-2 a su receptor en sujetos portadores de tumores malignos, la

12

respuesta inmune contra dicho tumor es mayor, provocando una disminución del tamaño tumoral. El estado de la técnica anterior indicaba que tal acción provocaría una inhibición de la respuesta del sistema inmune del individuo contra el tumor.

Los autores han encontrado que este efecto sobre el crecimiento del tumor se obtiene cuando
5 los niveles de IL-2 circulante disminuyen considerablemente tanto cuando el sujeto es sometido a terapia activa con la composición vacunal de la presente invención como cuando dicha disminución se logra aplicando terapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconocen la IL-2.

De ahí que la presente invención resulte de innegables ventajas para el tratamiento de
10 pacientes que sufren de tumores malignos y proporciona un método de vacunación con IL-2 eficaz, sencillo y mucho menos molesto y agresivo para los pacientes que los tratamientos convencionales usados en estos casos.

Los siguientes ejemplos incluyen los detalles experimentales y permiten ilustrar la eficacia inmunológica de las composiciones vacunales objeto de la invención.

15

EJEMPLOS:

La IL-2 humana recombinante (hIL-2r) se obtuvo comercialmente (US 5,614,185) para preparar la composición vacunal de la presente invención.

La proteína de membrana P64k, de Neisseria Meningitidis usada en el preparado vacunal se
20 obtuvo por vía recombinante y esta descrita en EP 0474313 A2 y US 5,286,484).

EJEMPLO 1: Respuesta de anticuerpos inducidos por la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.

Para promover la inmunogenicidad de la Interleucina-2 humana se puede conjug
25 químicamente a la proteína P64k de la Neisseria Meningitidis, que actúa como proteína transportadora. Esta conjugación se puede realizar por el método de Glutaraldehído (US 5,984,018). Por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% se verifica la eficiencia de la conjugación al aplicar muestras de cada uno de los componentes por separado (hIL-2r, P64k) comparado contra el conjugado químico hIL-2r-P64k y un patrón estándar de peso
30 molecular. Se puede comprobar que se forma un conjugado debido a la aparición de un continuo en la banda en la que se aplicó la hIL-2r-P64k (Figura 1).

Para evaluar la respuesta de anticuerpos contra la hIL-2r inducida por la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c, con los esquemas de inmunización A y B.

35 Se utilizó como control positivo un suero hiperinmune de animales respondedores a la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 y como control negativo un suero pre-inmune. Se definió como título de anticuerpos en los animales inmunizados, la mayor dilución a la cual la densidad óptica de los sueros fue mayor que el valor medio de la densidad óptica del suero pre-inmune más cinco veces la desviación estándar. Para definir el título en los animales controles se

(13) 13

utilizó el mismo criterio anterior excepto que se utilizó SSFT-SAB 1% en lugar de un suero pre-inmune como control negativo.

Se indujo respuesta de Acs llegándose a alcanzar títulos desde 1:100 hasta 1:50000. Este protocolo de inmunización dura alrededor de 52 días, por lo que era necesario hacer modificaciones para lograr los mismos o superiores resultados de títulos de Acs en el menor tiempo posible, así que utilizamos el esquema de inmunización B y obtuvimos similares resultados según se muestra en la Figura 2.

EJEMPLO 2: Ensayo de proliferación de la línea CTLL-2 tratada con sueros de animales vacunados con hIL-2-P64k/Montanide ISA 51.

Se evaluó si los anticuerpos presentes en los sueros de los animales vacunados con hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 eran capaces de unirse a la hIL-2r, para ello se realizó un ensayo de proliferación *in vitro* utilizando la línea CTLL-2, la cual es una línea dependiente de IL-2. Estas células se cultivaron en placas de cultivo con una dosis de hIL-2r necesaria para que estas proliferaran y fueron tratadas con diferentes diluciones de los sueros de animales que tuvieron títulos de Acs de alrededor de 1:10000 contra hIL-2r. Se observó que a medida que la concentración de anticuerpos en los pozos con las células CTLL-2 era mayor (dígase muestras de suero menos diluidas) entonces mayor era la inhibición de la proliferación de la línea CTLL-2 (Figura 3). Demostrando de esta manera que los Acs presentes en los sueros de animales vacunados eran capaces de inhibir la actividad biológica de la hIL-2r.

EJEMPLO 3: Experimentos antitumorales en animales tratados con la vacuna hIL-2-P64k/Montanide ISA 51.

Los animales fueron vacunados con la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 según el esquema B, y una semana después de la segunda inmunización fueron retados con 5×10^4 células del tumor F3II. Los tumores en los animales vacunados con hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 tuvieron una cinética de crecimiento más lenta que el grupo control, que fue inmunizado con SSFT-P64k/Montanide ISA 51 (Figura 4). Observándose diferencias significativas en el tamaño tumoral entre los dos grupos de animales analizados.

30

EJEMPLO 4: Ensayo de proliferación de la línea CTLL-2 tratada con un AcM específico anti IL-2.

Se evaluó si los anticuerpos específicos contra hIL-2r producidos a partir del hibridoma S4B6 (ATCC # HB-8794) eran capaces de unirse a la IL-2, para ello se realizó un ensayo de proliferación *in vitro* utilizando la línea CTLL-2. Estas células se cultivaron en placas de cultivo con una dosis de hIL-2r necesaria para que estas proliferaran y fueron tratadas con diferentes diluciones de los anticuerpos contra IL-2. Se observó que a medida que la concentración de anticuerpos en los pozos con las células CTLL-2 era mayor (dígase muestras de suero menos

40

diluidas) entonces mayor era la inhibición de la proliferación de la línea CTLL-2 (Figura 5). Se puede observar que con una dilución de los Acs de 1:100 se logra una inhibición de la proliferación de la línea CTLL-2 de más de un 80%. Demostrando de esta manera que los Acs eran capaces de inhibir la actividad biológica de la IL-2.

5

EJEMPLO 5: Experimentos antitumorales en animales tratados con anticuerpos monoclonales específicos contra IL-2 y contra CD25 (ATCC - PC61). Modelo experimental, tumor de mama 3FII.

Los animales fueron tratados con el anticuerpo monoclonal específico (contra hIL-2r o contra CD25 según el caso) por cinco días y dos días después fueron retados con 5×10^4 células del tumor F3II por vía subcutánea en la mama. Se midieron periódicamente los diámetros mayor y menor del tumor. Los tumores en los animales tratados con el AcM contra IL-2 tuvieron una cinética de crecimiento más lenta que el grupo control, que fue inmunizado con SSFT (Figura 6). Observándose diferencias significativas en el tamaño tumoral entre los dos grupos de animales analizados.

15

Los tumores en los animales tratados con el AcM contra CD25 (ATCC - PC61) tuvieron una cinética de crecimiento similar que el grupo control, que fue inmunizado con SSFT (Figura 6). No observándose diferencias significativas en el tamaño tumoral entre los dos grupos de animales analizados. Estos resultados muestran que aún en tumores donde no resultan eficaces procedimientos capaces de eliminar o disminuir la población celular CD25 positiva, la presencia de anticuerpos bloqueadores de la unión de la IL-2 a su receptor promueve un potente efecto antitumoral.

20

EJEMPLO 6: Experimentos antitumorales en animales tratados con anticuerpos monoclonales específicos contra IL-2 y contra CD25 (ATCC - PC61). Modelo experimental, Linfoma EL4.

25

A animales C57BL/6 fueron inoculados subcutáneamente con 5×10^4 células/ratón del linfoma EL4.

Los animales fueron tratados por vía intravenosa con una dosis de 1 mg del anticuerpo monoclonal específico anti-CD25 (PC61) dos días antes de inocular las células tumorales, o con una dosis diaria de 1 mg del anticuerpo monoclonal anti-IL-2 (S4B6) durante 5 días consecutivos, iniciando seis días antes la inoculación del tumor.

30

A otro grupo se le administró simultáneamente los dos anticuerpos monoclonales anti-CD25 y anti-IL-2 en un esquema similar al previamente descrito.

35

El crecimiento de los tumores fue registrado por medición periódica de los diámetros mayor y menor de los tumores. Las mediciones se realizaron dos veces por semana.

Las diferencias estadísticas para el tumor EL4 fueron (* $p=0.0232$, ** $p=0.0039$, *** $p<0.0001$).

La Figura 7 muestra que la combinación de ambos anticuerpos tuvo un efecto dramático sobre el crecimiento de los tumores.

40

5
(15)**EJEMPLO 7: La inducción de autoanticuerpos anti-IL-2 no afecta la respuesta a la vacuna de cáncer EGF**

Para evaluar si la respuesta de anticuerpos contra la hEGF inducida por la vacuna hEGF-P64k/Montanide ISA 51, se afectaba por la previa vacunación con hIL-2r, lo que conlleva a la inducción de autoanticuerpos, se inmunizaron animales BALB/c con el preparado vacunal hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 según el esquema A y 9 días después se inmunizaron los animales con el preparado vacunal hEGF-P64k/Montanide ISA 51 o con hEGF/Montanide ISA 51. En todos los experimentos donde se inmunizó con la vacuna de hEGF, se utilizó una dosis de 4 µg equivalentes de hEGF conjugado en el preparado vacunal en un volumen de 0.1 ml, administrada por vía intramuscular. Se utilizó como control positivo un suero hiperinmune de animales respondedores a la vacuna hEGF-P64k/Montanide ISA 51 y como control negativo un suero pre-inmune. Se definió como título de anticuerpos en los animales inmunizados, la mayor dilución a la cual la densidad óptica de los sueros fue mayor que el valor medio de la densidad óptica del suero pre-inmune más cinco veces la desviación estándar. Para definir el título en los animales controles se utilizó el mismo criterio anterior excepto que se utilizó SSFT-SAB 1% en lugar de un suero pre-inmune como control negativo.

Se obtuvo que los títulos de anticuerpos contra EGF inducidos por la vacunación con EGF/Montanide ISA 51 o con hEGF-P64k/Montanide ISA 51 no se afecta por la inducción de autoanticuerpos contra hIL-2r como se muestra en la Figura 8.

EJEMPLO 8: Neutralización de Interleucina-2 *in vivo* restaura la actividad citolítica de células de los nódulos linfáticos en sujetos portadores de tumor.

El efecto de la neutralización de IL-2 sobre la respuesta inmune a antígenos nominales en un individuo con tumor fue evaluado. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con Ovalbumina (OVA) (OVA grado VII (Sigma, St. Louis, MO) y poly I:C (Polyinosinic:polycytidylic acid, (PIC) (Sigma, St. Louis, MO), posteriormente se evaluó la actividad citolítica de las células de nódulos linfáticos a un péptido de la OVA. Esta evaluación se realizó *in vivo*, obteniéndose un máximo de respuesta.

La administración de una dosis diaria por 5 días consecutivos de 1mg del anticuerpo monoclonal anti-IL-2 por vía intravenosa no afecta la respuesta citolítica en estos animales. Ratones C57BL/6 desafiados con el tumor MB16F10 se convierten en inmunosuprimidos, con una reducida actividad citolítica a células cargadas con el péptido de OVA (péptido OVA₂₇₅₋₂₈₄ (SIINFEEKL)). Sin embargo, la administración *in vivo* de un anticuerpo monoclonal capaz de neutralizar la IL-2 restaura la respuesta inmune de las células de los nódulos linfáticos (Figura 9).

EXAMPLE 9: Neutralización de Interleucina-2 *in vivo* restaura la actividad citolítica de células de los bazo en sujetos portadores de tumor.

El efecto de la neutralización de IL-2 sobre la respuesta inmune a antígenos nominales en un individuo con tumor fue evaluado. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con OVA y Poly I:C,

la actividad citolítica de las células de bazo a un péptido de la OVA fue evaluado *in vivo* obteniéndose un máximo de respuesta. Administración de una dosis diaria por 5 días consecutivos de 1mg del anticuerpo monoclonal anti-IL-2 por vía intravenosa no afecta la respuesta citolítica en estos animales.

- 5 Ratones C57BL/6 desafiados con el tumor MB16F10 se convierten en inmunosuprimidos con una reducida actividad citolítica a OVA. Sin embargo, la administración *in vivo* de un anticuerpo monoclonal capaz de neutralizar la IL-2 restaura la respuesta inmune de las células del bazo (Figura 10).

10

EJEMPLO 10: Conteo de células sanguíneas en animales inmunizados con el preparado vacunal hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.

- 15 Con el objetivo de evaluar si la inmunización con el preparado vacunal hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 inducía cambios en el número de células de la sangre se hizo un conteo de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, tanto de animales inmunizados con el preparado vacunal (según el esquema A) o animales sin vacunar, a los 100 días después de la primera inmunización. Como se muestra en la Figura 11, no se obtuvo diferencias en los conteos celulares entre los grupos analizados.

20

Breve descripción de las figuras.

- 25 **Figura 1:** Electroforesis del conjugado químico hIL-2r-P64k. Las bandas de izquierda a derecha se corresponden a la P64k, hIL-2r, hIL-2r-P64k y un patrón estándar de peso molecular, respectivamente.

- 30 **Figura 2:** Títulos de anticuerpos contra hIL-2r inducidos por la vacunación hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 utilizando los dos esquemas de inmunización explicados anteriormente. El eje de las y representa la media geométrica de los títulos de anticuerpos contra IL-2. El eje de las x los grupos que corresponden a animales inmunizados con :

Control : P64k/Montanide ISA 51.

Esq A IL-2: hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 según esquema A.

Esq B IL-2: hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 según esquema B.

- 35 **Figura 3:** Proliferación de la línea CTLL-2 en presencia de hIL-2r y diferentes diluciones de sueros de animales inmunizados con la vacuna hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 y que tuvieron títulos del orden de 1:1000 hasta 1:50 000.

- 40 **Figura 4:** Cinética tumoral de animales vacunados con la vacuna de hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 o con P64k/Montanide ISA 51 (grupo control) y posteriormente retados con el tumor

F3II. El eje de las *y* representa el área tumoral definida como diámetro mayor x diámetro menor escogidos perpendicularmente.

Figura 5: Proliferación de la línea CTLL-2 en presencia de hIL-2r y diferentes diluciones de anticuerpos contra IL-2.

Figura 6: Cinética tumoral de animales tratados con el AcM α IL-2, con el AcM α CD25 o con PBS (grupo control) y posteriormente retados con el tumor F3II. El eje de las *y* representa el área tumoral definida como diámetro mayor x diámetro menor escogidos perpendicularmente.

10

Figura 7: Cinética tumoral de animales tratados con el AcM α IL-2, con el AcM α CD25 o con PBS (grupo control) y posteriormente retados con el tumor EL4. El eje de las *y* representa el área tumoral definida como diámetro mayor x diámetro menor escogidos perpendicularmente (* significación estadística).

15

Figura 8: Títulos de anticuerpos contra EGF inducidos por la vacunación con hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 y con hEGF-P64k/Montanide ISA 51. El eje de las *y* representa la media geométrica de los títulos de anticuerpos contra EGF. El eje de las *x* los grupos que corresponden a animales inmunizados con:

20

hIL-2r: hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51.

hEGF: hEGF/Montanide ISA 51

hIL-2r+hEGF: hIL-2r-P64k/Montanide + hEGF/Montanide.

hEGF/P64k: hIL-2r-P64k/Montanide + hEGF/Montanide.

25 hIL-2r+hEGF/P64k: hIL-2r-P64k/Montanide + hEGF/P64k/Montanide.

Figura 9: Anticuerpos inducidos a IL-2 restaura la actividad citolítica evaluada en células de nódulos linfáticos en individuos portadores con tumor.

Todos los ratones fueron inmunizados subcutáneamente el día 0 con 1 mg de OVA y 100 μ g por ratón de Poly I:C y los siguientes dos días fue administrado sólo Poly I:C. El ensayo de actividad citolítica *in vivo* fue determinada usando células de bazo de animales vírgenes diferencialmente marcadas con el colorante fluorescentes CFSE. Las células con CFSEhigh fueron usadas como blanco y cargadas con SIINFEKL, mientras que las marcadas CFSElow sin pulsar sirvieron como control interno y entonces fueron co-inyectadas por vía intravenosa en una proporción 1:1 a los animales previamente inmunizados. La actividad citolítica fue evaluada en células de nódulos linfáticos.

30

Control –animales tratados con PBS, α IL-2 –animales tratados con un anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-2, MB16F10 –animales igual al control, pero además desafiados con

MB16F10, α IL-2+MB16F10 –animales portadores del tumor MB16F10 tratados con un anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-2.

Figura 10: Anticuerpos inducidos a IL-2 restaura la actividad citolítica evaluada en células de bazo en individuos portadores con tumor.

5 Todos los ratones fueron inmunizados subcutáneamente el día 0 con 1 mg de OVA y 100 μ g por ratón de Poly I:C y los siguientes dos días fue administrado sólo Poly I:C. El ensayo de actividad citolítica *in vivo* fue determinada usando células de bazo de animales vírgenes diferencialmente marcadas con el colorante fluorescentes CFSE. Las células con CFSEhigh
10 fueron usadas como blanco y cargadas con SIINFEKL, mientras que las marcadas CFSElow sin pulsar sirvieron como control interno y entonces fueron co-inyectadas por vía intravenosa en una proporción 1:1 a los animales previamente inmunizados. La actividad citolítica fue evaluada en células de bazo.

Control –animales tratados con PBS, α IL-2 –animales tratados con un anticuerpo monoclonal
15 neutralizante de IL-2, MB16F10 –animales igual al control, pero además desafiados con MB16F10, α IL-2+MB16F10 –animales portadores del tumor MB16F10 tratados con un anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-2.

**Figura 11: Conteo de células sanguíneas (leucocitos (G blancos), eritrocitos (G rojos),
20 Plaquetas en animales inmunizados con el preparado vacunal hIL-2r-P64k/Montanide ISA 51 (IL-2) o con P64k/Montanide ISA 51.**

25

30

REIVINDICACIONES;

1. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, útil en el tratamiento de individuos con cáncer, caracterizada porque dicha formulación comprende al menos uno de:
 - A.- IL-2 o cualquier derivado de esta acoplada a una proteína transportadora genéticamente o por conjugación química y un adyuvante apropiado.
 - B.- Un anticuerpo monoclonal anti-IL-2.
 - ✓ C.- Una vacuna de cáncer basada en antígenos específicos de tumores o factores de crecimiento.
 - D.- Un anticuerpo monoclonal anti-CD25.
2. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 1 caracterizada porque dicha formulación comprende la administración simultánea o secuencial de; A más C o A más D o B más C o B más D.
3. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 1 caracterizada porque dicha formulación comprende IL-2 o cualquier derivado acoplada a una proteína transportadora y un adyuvante apropiado.
4. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 3 caracterizada porque dicha formulación comprende IL-2 acoplada a una proteína transportadora y un adyuvante apropiado.
5. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 4, caracterizada porque la proteína transportadora es la proteína P64k derivada de Nisseria Meningitidis.
6. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 5, caracterizada porque el adyuvante apropiado es seleccionado del grupo que comprende hidróxido de alúmina y Montanide ISA 51.
7. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 6, caracterizada porque comprende Montanide ISA 51 como adyuvante.
8. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 1, caracterizada porque comprende el conjugado químico entre la IL-2 y la P64k.

9. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 1, caracterizada porque comprende una proteína de fusión entre la IL-2 y la P64k.
- 5 10. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 1, caracterizada porque comprende una proteína de fusión entre péptidos derivados de la IL-2 y la P64k.
- 10 11. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 1 caracterizada porque dicha formulación comprende un anticuerpo monoclonal específico contra la IL-2 humana.
- 15 12. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 2 caracterizada porque dicha formulación comprende la administración de IL-2 o cualquier derivado acoplada a una proteína transportadora y un adyuvante apropiado en combinación con una vacuna de cáncer basada en antígenos específicos de tumores o factores de crecimiento.
- 20 13. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 12, caracterizada por que la vacuna de cáncer contiene EGF.
- 25 14. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 2 caracterizada porque dicha formulación comprende la administración de IL-2 o cualquier derivado acoplada a una proteína transportadora y un adyuvante apropiado en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-CD25.
- 30 15. Una formulación terapéutica capaz de producir una respuesta inmune contra la IL-2, según reivindicación 13 caracterizada porque además comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD25.
- 35 16. Las formulaciones terapéuticas de las reivindicaciones 1 a 15, para la manufactura de un medicamento que induzca una respuesta inmune contra la IL-2, capaz de inhibir el crecimiento de los tumores en pacientes de cancer.
- 40 17. Uso de la formulación terapéutica de las reivindicaciones de la 1 a la 15, caracterizada porque inhibe el crecimiento de los tumores.

1/6

Figuras

Figura 1

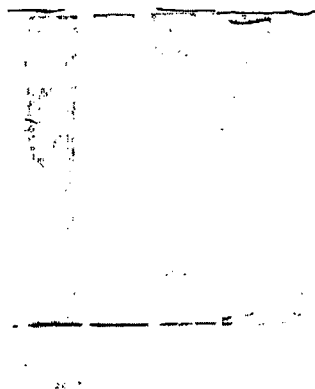
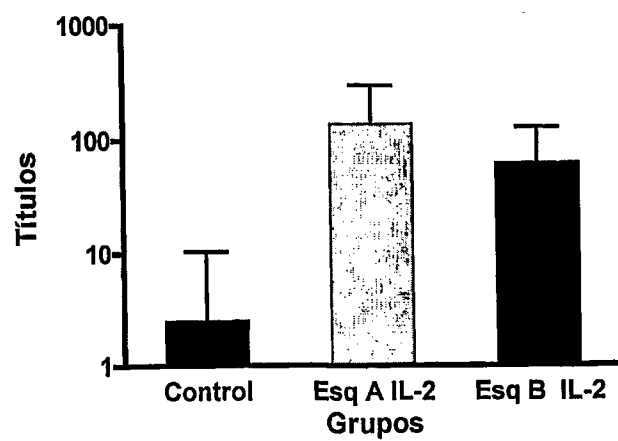


Figura 2



22 22

2/6

Figura 3

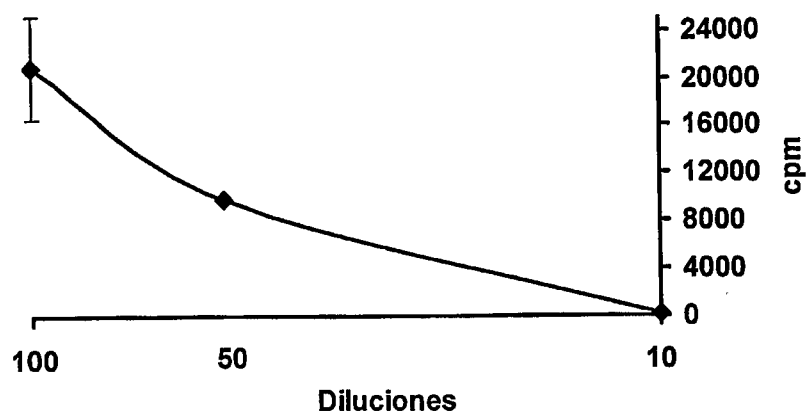
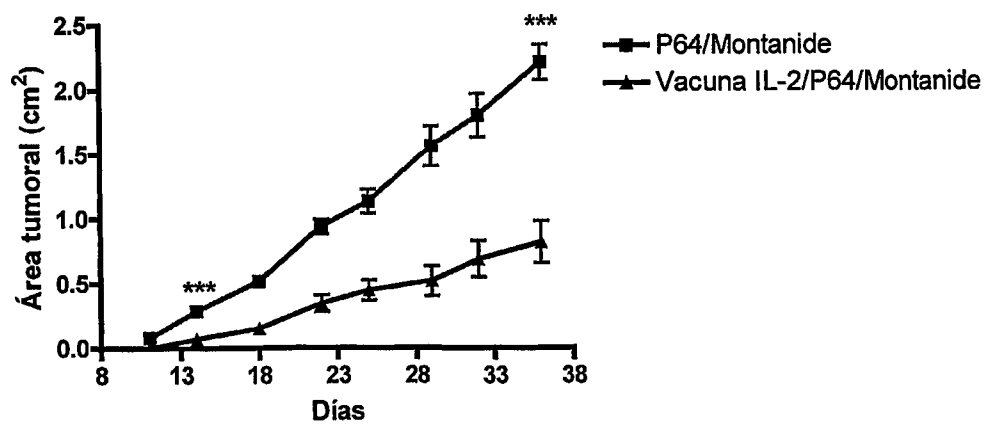


Figura 4

Mann Whitney test (** $p < 0.0002$).

23

3/6

Figura 5

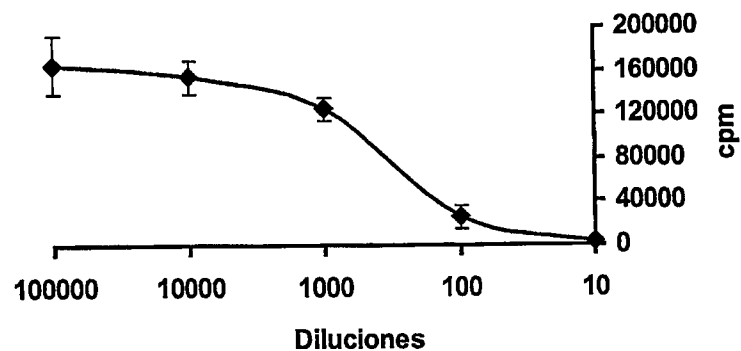
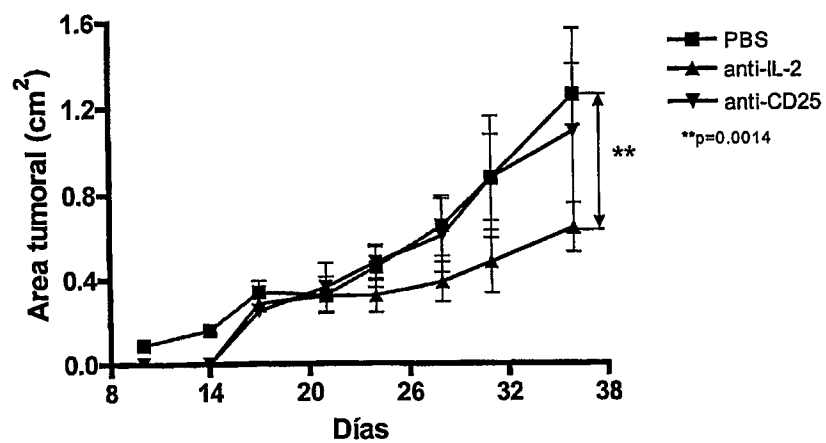


Figura 6



24

4/6

Figura 7

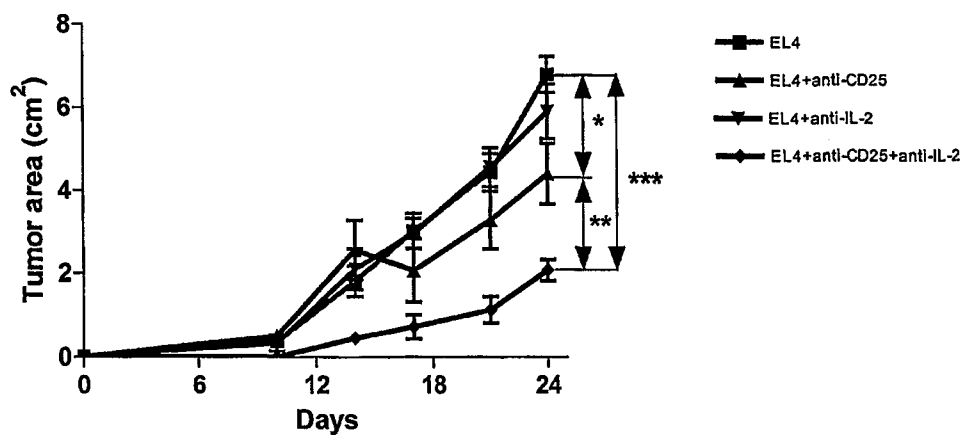
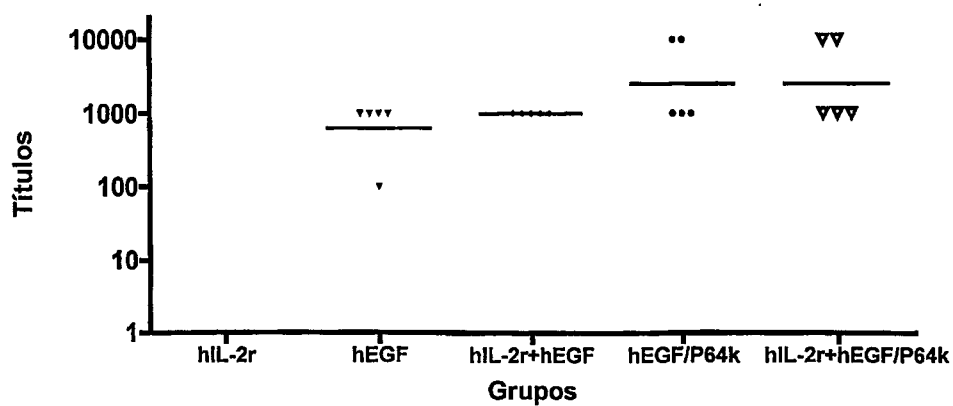


Figura 8



5/6

Figura 9

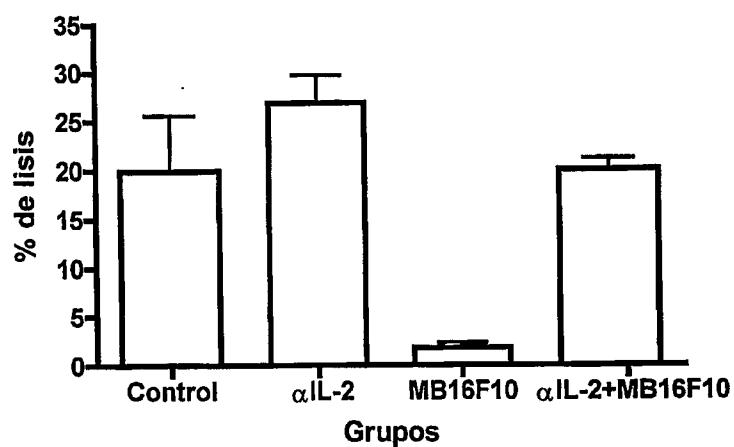
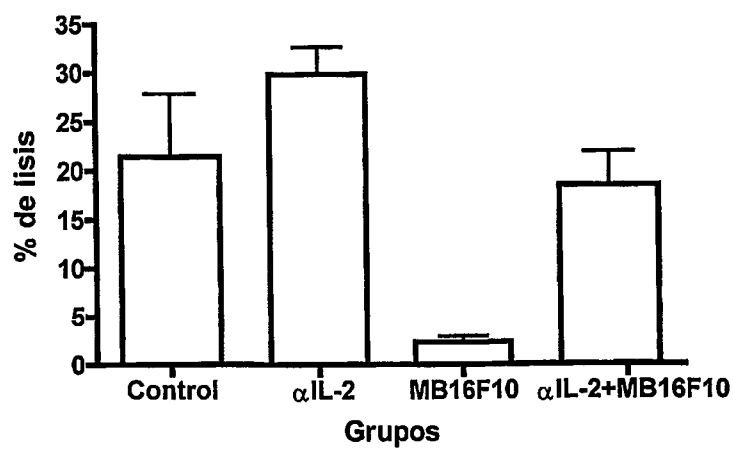
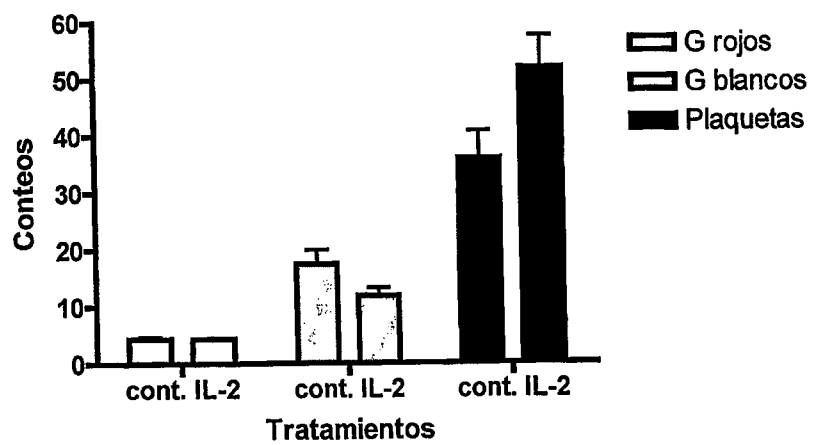


Figura 10



6/6

Figura 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2005/000009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/55 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A61K, C12N

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

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03045997 A (TARRO, G.) 05.06.2003	1-4, 12-17
Y	Page 4, lines 8 - 25	5-10
X	US 6060068 A (DOYLE et al.) 09.05.2000	1-4
	Page 3, line 5 - page 4, line 55	
X	WO 02087304 A (FROHNHOFEN et al.) 07.11.2002	1
	Page 1, line 5 - page 8, line 12	
	US 5830452 A (BAUER et al.) 03.11.1998	
X	Column 2, line 50 - column 3, line 10	1-4
	EP 0474313 A (CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA	
Y	Y BIOTECNOLOGÍA) 11.03.1992	5-10
	Abstract, Page 7, lines 36-40	
	US 5614185 A (CHIRON CORP.) 25.03.1997	
A	Column 1, line 65- column 2, line 20	1-10, 12-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

08 FEB 2005 (08.02.05)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

S.P.T.O.

Facsimile No.

Telephone No.

72
27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2005/000009

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **Part C of claim 1 and claim 12**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The subject matter of the claims is not defined clearly and concisely. The description should disclose the invention clearly and completely.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

First invention: the part of claim 1 which consists in a treatment formulation that contains IL-2 or derivative coupled to the carrier protein and adjuvant (A); the part of claim 2 which refers to (A+C) or (A+D), and claims 3-10 and 12-17;

Second invention: the part of claim 1 which consists in a treatment formulation that contains the monoclonal antibody anti-IL-2 (B), the part of claim 2 that refers to (B+C) or (B+D), and claim 11;

Third invention: part C of claim 1 referring to a cancer vaccine based on tumour antigens or growth factors;

Fourth invention: part D of claim 1 that refers to the monoclonal antibody anti-CD25.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Parte de la reivindicación 1: Formulación terapéutica que contiene IL-2 o derivado acoplada a proteína transportadora y adyuvante(A), parte de la reivindicación 2 referida a (A+ C) o (A + D), y las reivindicaciones 3-10 y 12-17

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ CU 2005/000009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03045997 A	05.06.2003	ITMI 20012527A CA 2468718 A EP 1448603 A US 2005042199 A JP 2005513040 T	30.05.2003 05.06.2003 25.08.2004 24.02.2005 12.05.2005 12.05.2005
US 6060068 A	09.05.2000	AU 6294386 A CN 86106369 A EP 0219979 A JP 62123129 A JP 2680809 B AU 587065 B EP 0400762 A CA 1297003 C US 5100664 A AT 74511 T DE 3684755 D US 5503841 A US 5643565 A US 5800810 A	26.03.1987 01.04.1987 29.04.1987 04.06.1987 19.11.1997 03.08.1989 05.12.1990 10.03.1992 31.03.1992 15.04.1992 14.05.1992 02.04.1996 01.07.1997 01.09.1998 01.09.1998 01.09.1998
WO02087304A A	07.11.2002	NONE	-----
EP 0474313 A	11.03.1992	CA 2050749 A FI 914129 A FI 103511 B AU 8368391 A US 5286484 A AR 245778 A JP 6169779 A JP 3253327 B CU 22302 B AU 657487 B AT 152175 T DE 69125769 D ES 2103295 T GR 3024127 T DE 69125769 T RU 2132383 C IL 99401 A	08.03.1992 08.03.1992 15.07.1999 12.03.1992 15.02.1994 28.02.1994 21.06.1994 04.02.2002 02.12.1994 16.03.1995 15.05.1997 28.05.1997 16.09.1997 31.10.1997 27.11.1997 27.06.1999 10.12.2003
US 5614185 A	25.03.1997	PT 80172 A GR 850741 A	01.04.1985 26.06.1985

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ CU 2005/000009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		IE 59100 B	12.01.1994
		IE 850799 L	28.09.1985
		FI 851231 A	29.09.1985
		FI 94960 B	15.08.1995
		FI 94960 C	27.11.1995
		DK 135985 A	29.09.1985
		DK 166324 B	05.04.1993
		DK 166324 C	23.08.1993
		NO 851235 A	30.09.1985
		EP 0156373 A	02.10.1985
		AU 4046785 A	03.10.1985
		JP 61001393 A	07.01.1986
		JP 2599903 B	16.04.1997
		US 4569790 A	11.02.1986
		ZA 8502347 A	26.11.1986
		ES 8609362 A	16.12.1986
		PH 21012 A	23.06.1987
		NZ 211569 A	30.05.1988
		IN 162903 A	23.07.1988
		AU 592751 B	25.01.1990
		IL 74733 A	05.11.1990
		EP 0470586 A	12.02.1992
		AT 81674 T	15.11.1992
		DE 3586762 D	26.11.1992
		DE 3586762 T	25.02.1993
		US 5419899 A	30.05.1995
		JP 8332089 A	17.12.1996
		JP 2648587 B	03.09.1997
		DE 3588189 D	20.08.1998
		DE 3588189 T	19.11.1998
		HK 1004474 A	17.03.2000
		CA 1341083 C	15.08.2000

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ CU 2005/000009

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/55 (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07K, A61K, C12N

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

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CAS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 03045997 A (TARRO, G.) 05.06.2003 Página 4, líneas 8 - 25	1-4, 12-17
Y		5-10
X	US 6060068 A (DOYLE et al.) 09.05.2000 Página 3, línea 5 - página 4, línea 55	1-4
X	WO 02087304 A (FROHNHOFEN et al.) 07.11.2002 Página 1, línea 5 - página 8, línea 12	1
X	US 5830452 A (BAUER et al.) 03.11.1998 Columna 2, línea 50 - columna 3, línea 10	1-4
Y	EP 0474313 A (CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGÍA) 11.03.1992 Resumen, Página 7, líneas 36-40	5-10
A	US 5614185 A (CHIRON CORP.) 25.03.1997 Columna 1, línea 65- columna 2, línea 20	1-10, 12-17

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

08 FEBRERO 2005 (08-02-2006)

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

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

A. Collados Martín Posadillo

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 349

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2005/000009

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°s: parte C de la reivindicación 1 y reivindicación 12
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones no está definido de una forma clara y concisa. La invención debe estar divulgada en la descripción de una forma clara y completa.
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
1ª invención : Parte de la reivindicación 1 que consiste en una formulación terapéutica que contiene IL-2 o derivado acoplada a proteína transportadora y adyuvante(A) , parte de la reivindicación 2 referida a (A+ C) o (A + D), y reivindicaciones 3-10 y 12-17; 2ª invención: Parte de la reivindicación 1 que consiste en una formulación terapéutica que contiene anticuerpo monoclonal anti-IL-2 (B) , parte de la reivindicación 2 referida a (B+ C) o (B + D), y reivindicación 11; 3ª invención: Parte C de la reivindicación 1 referida a una vacuna de cáncer basada en antígenos de tumores o factores de crecimiento; 4ª invención: Parte D de la reivindicación 1 referida a anticuerpo monoclonal anti-CD25

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s: Parte de la reivindicación 1: Formulación terapéutica que contiene IL-2 o derivado acoplada a proteína transportadora y adyuvante(A) , parte de la reivindicación 2 referida a (A+ C) o (A + D), y las reivindicaciones 3-10 y 12-17

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales una protesta por parte del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2005/000009

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03045997 A	05.06.2003	ITMI 20012527A	30.05.2003
		CA 2468718 A	05.06.2003
		EP 1448603 A	25.08.2004
		US 2005042199 A	24.02.2005
		JP 2005513040 T	12.05.2005
			12.05.2005
US 6060068 A	09.05.2000	AU 6294386 A	26.03.1987
		CN 86106369 A	01.04.1987
		EP 0219979 A	29.04.1987
		JP 62123129 A	04.06.1987
		JP 2680809 B	19.11.1997
		AU 587065 B	03.08.1989
		EP 0400762 A	05.12.1990
		CA 1297003 C	10.03.1992
		US 5100664 A	31.03.1992
		AT 74511 T	15.04.1992
		DE 3684755 D	14.05.1992
		US 5503841 A	02.04.1996
		US 5643565 A	01.07.1997
		US 5800810 A	01.09.1998
			01.09.1998
			01.09.1998
WO02087304A A	07.11.2002	NINGUNO	-----
EP 0474313 A	11.03.1992	CA 2050749 A	08.03.1992
		FI 914129 A	08.03.1992
		FI 103511 B	15.07.1999
		AU 8368391 A	12.03.1992
		US 5286484 A	15.02.1994
		AR 245778 A	28.02.1994
		JP 6169779 A	21.06.1994
		JP 3253327 B	04.02.2002
		CU 22302 B	02.12.1994
		AU 657487 B	16.03.1995
		AT 152175 T	15.05.1997
		DE 69125769 D	28.05.1997
		ES 2103295 T	16.09.1997
		GR 3024127 T	31.10.1997
		DE 69125769 T	27.11.1997
		RU 2132383 C	27.06.1999
		IL 99401 A	10.12.2003
US 5614185 A	25.03.1997	PT 80172 A	01.04.1985
		GR 850741 A	26.06.1985

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU 2005/000009

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
		IE 59100 B	12.01.1994
		IE 850799 L	28.09.1985
		FI 851231 A	29.09.1985
		FI 94960 B	15.08.1995
		FI 94960 C	27.11.1995
		DK 135985 A	29.09.1985
		DK 166324 B	05.04.1993
		DK 166324 C	23.08.1993
		NO 851235 A	30.09.1985
		EP 0156373 A	02.10.1985
		AU 4046785 A	03.10.1985
		JP 61001393 A	07.01.1986
		JP 2599903 B	16.04.1997
		US 4569790 A	11.02.1986
		ZA 8502347 A	26.11.1986
		ES 8609362 A	16.12.1986
		PH 21012 A	23.06.1987
		NZ 211569 A	30.05.1988
		IN 162903 A	23.07.1988
		AU 592751 B	25.01.1990
		IL 74733 A	05.11.1990
		EP 0470586 A	12.02.1992
		AT 81674 T	15.11.1992
		DE 3586762 D	26.11.1992
		DE 3586762 T	25.02.1993
		US 5419899 A	30.05.1995
		JP 8332089 A	17.12.1996
		JP 2648587 B	03.09.1997
		DE 3588189 D	20.08.1998
		DE 3588189 T	19.11.1998
		HK 1004474 A	17.03.2000
		CA 1341083 C	15.08.2000

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

Agustín D. Lago Davila
en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Cuba

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en
Calle 216 Esq. 15 Atabey, Paya,

Ciudad de La Habana, 12100, Cuba.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en La Habana, Cuba
a los 15 días de Octubre, 2005

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

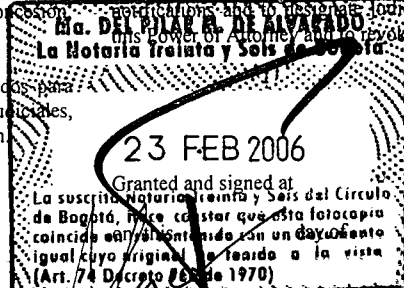
legal representative(s) of

an organization existing under the laws of

and in present execution of its business activity, domiciled at

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.



Firma/Signature

of

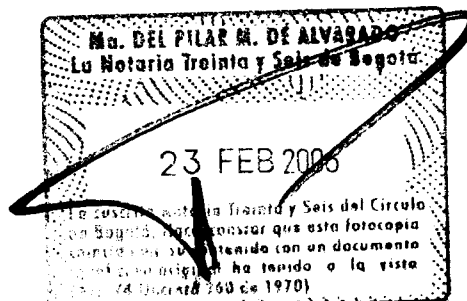
53

Y para que así conste se expide en la Ciudad de la Habana, a los 19 días del mes de enero de 2006. -----

[illegible]

LA HABANA 20 ENE. 2006

DECLARACION AUTORIZACION PARA ENTREGA DE AUTENTICACION DE FIRMAS EN
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD PARA ENTREGA DE FIRMAS EN EXTRANJERO
CERTIFICADO QUE EL PODERES ES AUTENTICA POR EL FUNCIONARIO AUTORIZADO DE ESTE DOCUMENTO
LA FIRMA QUE SE PRESENTA POR LA SEMEJANZA QUE GUARDA CON LA QUE OTRA REGISTRADA
EN ESTE CENTRO LUGAR LA QUE FIRMAS ACOSUETUDARIAS EN LOS ACTOS OFICIALES
EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA FIRMAS DEL CENTRO FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO



36



Consulado General de Colombia
LA HABANA, CUBA

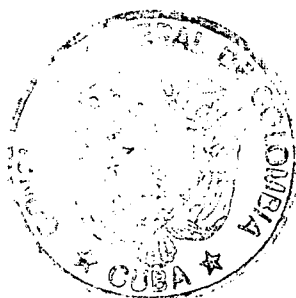
No.07/06

La Habana, Enero 27 de 2006

El suscrito Cónsul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que la Señora María Silvia Fernández Villar, quien como funcionario de la Dirección de Asuntos Consulares y de Cubanos Residentes en el Exterior del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma de la Licenciada Estrella Díaz Bosmenier, Notaria de la Notaría Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, con competencia nacional y sede en la Cámara de Comercio, quien 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 INMUNOLOGIA MOLECULAR, es una entidad constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; que el Doctor Agustín Bienvenido Lage Dávila, quien en su carácter de Director de la mencionada entidad es su representante legal en este país.

El Cónsul General de Colombia, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



Benjamín Higuera Rivera
Cónsul General

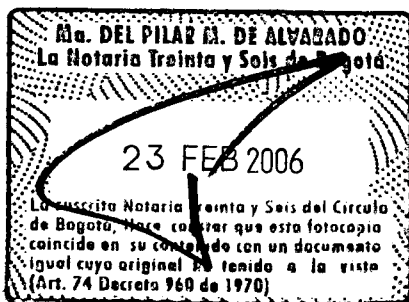
65482
Benjamín Higuera
CUIA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

US\$ 9.00 (nueve dólares)
US\$ 100.00 (cien dólares)
US\$ 109.00 (ciento nueve dólares)



2006 FEB 22 A 11:35
Jefe de Legación
SANTIAPO DE BOGOTÁ D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

36



No. 07-052069-00000-0000

Fecha: 2007-05-24 16:03:10 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 36



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

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 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 se 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 trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

24 MAYO 2007

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia