



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-050436-00000-0000

Fecha: 2011-04-25 17:28:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT
SOLICITUD

INVENTARIO

PATENTE DE INVENCION

11-50436

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 9/127

71. SOLICITANTE DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD

DOMICILIO MIDDLESEX, INGLATERRA Y
AUSTRALIAN CAPITAL TERRITORY, AUSTRALIA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)

21-05-2011

M. C.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-050436-00000-0000

Fecha: 2011-04-25 17:28:47

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 133

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD**

Dirección: 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS, Inglaterra e Innovations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200, Australia.

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex, Inglaterra y Australian Capital Territory, Australia.

Lugar de Constitución: Inglaterra.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **ALTIN, Joseph; ATMOSUKARTO, Ines; DE WILDT, Rudolf, Maria; PARISH, Christopher y PRICE, Jason.**

Dirección: Lipotek Pty Ltd, Innovations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200 y 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG.

Nacionalidad o Domicilio: Australia e Inglaterra.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/063656

Fecha: 19/10/09

Publicación Internacional No. WO 2010/046338 A1

Fecha: 29/04/10

⑥

Título (54)

"COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 9/127

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

21/10/08

(31) Número de Solicitud

61/107,095

⑨

Comprobante de Pago No. 11-0021248

Fecha: 8 de Marzo de 2011

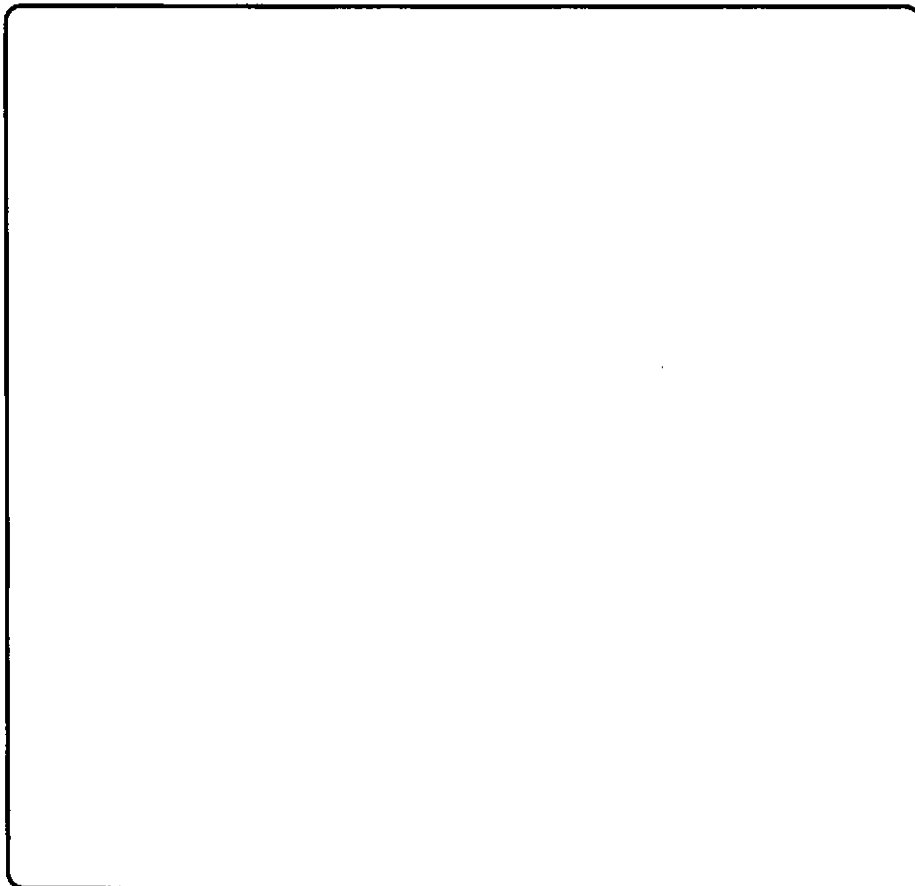
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. (Poder DOMANTIS LIMITED)
- ☐ 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 reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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.
- ☐ 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, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0021248
		Bogotá D.C., Marzo 08 de 2011 - 06:32:01

RECIBIDO DE : LLORED A & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414995081	07/03/2011	26.246.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			===== \$571.000.00 =====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-050436- -00000-0000

Fecha: 2011-04-25 17:26:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 8 de 2011 - 06:32:06

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLORED A RICAURTE
T.P. No. 53.215

4

TRADUCCION OFICIAL No. 2007-06-16-455
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Certificado Notarial, documento también escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

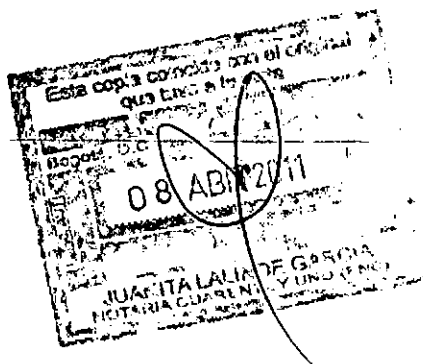
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 10 de mayo de 2007
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Comunidad de Naciones
8. Número: **H381888**
9. Sello/estampilla:
Sello de la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth
10. Firma: (ilegible)
R. Shilton
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
864337
P. de E. de E.
CONFIRMA APLICACION
DOCUMENTO DE SU MAJESTAD
LAS FUERZAS ARMADAS
2007 JUN 21 A 10:30
BOGOTÁ, C.
NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DE LA
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
COSTA
NITA ESCOBAR DETAMAYO

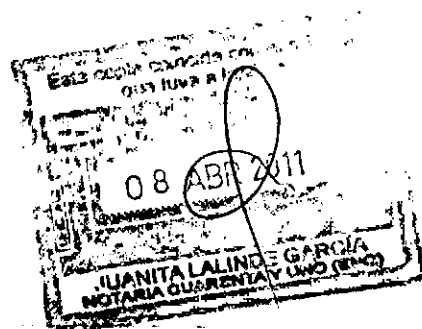


correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 19 de junio de 2007, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **James Kerr MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

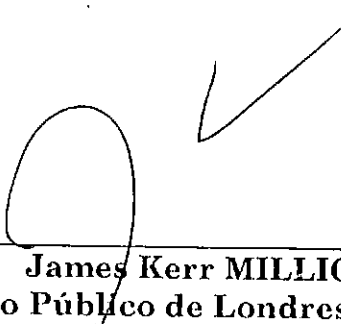
CERTIFICO:

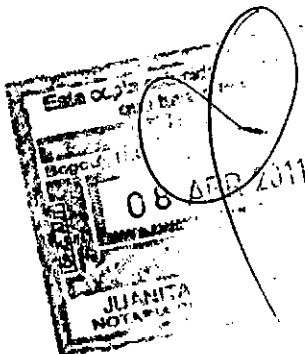
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**DOMANTIS LIMITED**", sociedad privada de responsabilidad limitada debidamente constituida, organizada y existente de acuerdo con la ley inglesa, en actual funcionamiento, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades de Inglaterra y Gales bajo el número **3907643**, con domicilio social en 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 13 de marzo de 2007, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy nueve de mayo del año dos mil siete.


James Kerr MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



Los abajo firmad

DC

Una

Exis

I

con domicilio
980
H:221

nombramos
GUSTAVO
y/o ENRIQUE
Colombia.
5-83, pis
verdader
notificac
extrajuc
parágr
1971.

TAM

ALV

des

rep

ad

tri

e

a

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **James Kerr Milligan**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le **10 May 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No

H381888

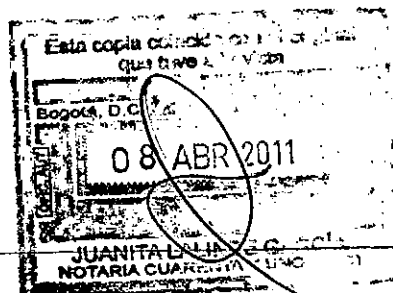
9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **R Shilton**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



Los abajo firmados,

Domantis Limited
Una sociedad organizada y
existente bajo las leyes de
Inglaterra.

con domicilio en
980 Great West Road, Brentford,
Middlesex TW8 9GS, GB.

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado 8 mayo, 2007

Domantis Limited

domiciled at

980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB
(formerly of 315 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0WG, GB)

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

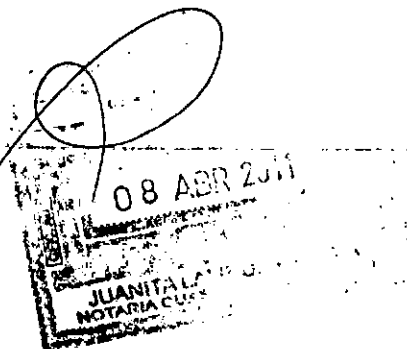
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

- 8 MAY 2007

Given and signed this

Peter John GIDDINGS
Attorney and Authorised Official

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 25-04-11 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/107,095 21-10-08 US		(51) Int Cl: A61K 9/127 (71) Solicitante(s): DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD (72) Inventor(es): ALTIN, Joseph; ATMOSUKARTO, Ines; DE WILDT, Rudolf, Maria; PARISH, Christopher y PRICE, Jason. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-05-11 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 19-10-09 No. de solicitud: PCT/EP2009/063656		(87) Publicación internacional Fecha: 29-04-10 N° publicación: WO 2010/046338 A1	
(54) Título: COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS			

Resumen - Reivindicación(es):

Sector: Preparaciones medicinales que contienen antígenos o anticuerpos y que actúan como agentes antineoplásicos.

Resumen.-

La presente invención se refiere a una composición para dirigirse a las células dendríticas. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende: a) uno o más antígenos; b) un solo dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN; y c) un vehículo que es portador de a) y b). La invención se refiere además a formulaciones, composiciones, y dispositivos que comprenden estas moléculas anti-DC-SIGN, y su uso como un medicamento, y en el tratamiento de cáncer, adecuadamente melanoma.

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 25-04-11

(51) Clasificación Internacional: A61K 9/127

(71) Solicitante(s): DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD

(72) Inventor(es): ALTIN, Joseph; ATMOSUKARTO, Ines; DE WILDT, Rudolf, Maria; PARISH, Christopher y PRICE, Jason.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/107,095	21-10-08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-05-11

(87) Publicación internacional

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

Fecha: 29-04-10

Fecha de presentación de la solicitud: 19-10-09

N° publicación: WO 2010/046338 A1

No. de solicitud: PCT/EP2009/063656

(54) Título: COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

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

(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 25-04-11	
(51) Clasificación Internacional: A61K 9/127			
(71) Solicitante(s): DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD			
(72) Inventor(es): ALTIN, Joseph; ATMOSUKARTO, Ines; DE WILDT, Rudolf, Maria; PARISH, Christopher y PRICE, Jason.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/107,095	21-10-08	US
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 21-05-11		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 29-04-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 19-10-09		No. Publicación : WO 2010/046338 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2009/063656			

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Titulo:

COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

(57) Resumen:

Sector: Preparaciones medicinales que contienen antígenos o anticuerpos y que actúan como agentes antineoplásicos.

Resumen.-

La presente invención se refiere a una composición para dirigirse a las células dendríticas. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende: a) uno o más antígenos; b) un solo dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN; y c) un vehículo que es portador de a) y b). La invención se refiere además a formulaciones, composiciones, y dispositivos que comprenden estas moléculas anti-DC-SIGN, y su uso como un medicamento, y en el tratamiento de cáncer, adecuadamente melanoma.

AD

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference IJF/DB00061	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/063656	International filing date (day/month/year) 19/10/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 21/10/2008
Applicant DOMANTIS LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
☐ as suggested by the applicant
☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/063656

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/063656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/127 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04

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

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/018610 A (LIPOTEK PTY LTD [AU]; ALTIN JOSEPH [AU]; PARISH CHRISTOPHER RICHARD [A] 3 March 2005 (2005-03-03) the whole document	1-29
Y	VAN BROEKHOVEN CHRISTINA L ET AL: "Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD., US, vol. 64, no. 12, 15 June 2004 (2004-06-15), pages 4357-4365, XP002443804 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-29
-/--		



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

5 February 2010

Date of mailing of the international search report

04/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Morawetz, Renate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/063656

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KRETZ-ROMMEL ANKE ET AL: "In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 30, no. 7, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 715-726, XP009094216 ISSN: 1524-9557 the whole document	1-29
Y	TACKEN PAUL J ET AL: "Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody" BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 106, no. 4, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 1278-1285, XP002449006 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-29
Y	TACKEN P J ET AL: "Targeting antigens to dendritic cells in vivo" IMMUNOBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 211, no. 6-8, 14 September 2006 (2006-09-14), pages 599-608, XP025160890 ISSN: 0171-2985 [retrieved on 2006-09-14] the whole document	1-29
Y	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	1-29
Y	DEMAREST STEPHEN J ET AL: "Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability" CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 11, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 675-687, XP008108499 ISSN: 1367-6733 the whole document	1-29
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/063656

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/035572 A (DOMANTIS LTD [GB]; TOMLINSON IAN [GB]; BASRAN AMRIK [GB]; JONES PHILIP) 21 April 2005 (2005-04-21) the whole document -----	
A	MAHNKE KARSTEN ET AL: "Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD., US, vol. 65, no. 15, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 7007-7012, XP002464332 ISSN: 0008-5472 the whole document -----	
A	HERSEY PETER ET AL: "Adjuvant immunotherapy of patients with high-risk melanoma using vaccinia viral lysates of melanoma: results of a randomized trial." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 15 OCT 2002, vol. 20, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 4181-4190, XP002567149 ISSN: 0732-183X the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/063656

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005018610 A	03-03-2005	CN 1893925 A	10-01-2007
		EP 1660040 A1	31-05-2006
		JP 2007502780 T	15-02-2007
		US 2007026057 A1	01-02-2007
WO 2005035572 A	21-04-2005	AT 414106 T	15-11-2008
		AU 2004220325 A1	23-09-2004
		CA 2539999 A1	21-04-2005
		DK 1639011 T3	16-02-2009
		EP 1720906 A2	15-11-2006
		ES 2315664 T3	01-04-2009
		JP 2008500268 T	10-01-2008
		PT 1639011 E	20-01-2009
		SI 1639011 T1	30-04-2009
		ZA 200702879 A	27-08-2008



- (51) International Patent Classification:
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2009/063656
- (22) International Filing Date:
19 October 2009 (19.10.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/107,095 21 October 2008 (21.10.2008) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): **DO-MANTIS LIMITED** [GB/GB]; 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB). **LIPOTEK PTY LTD** [AU/AU]; Innovations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200 (AU).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **ALTIN, Joseph** [AU/AU]; Lipotek Pty Ltd, Innovations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200 (AU). **ATMOSUKARTO, Ines** [ID/AU]; Lipotek Pty Ltd, Innovations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200 (AU). **DE WILDT, Rudolf, Maria** [NL/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **PARISH, Christopher** [AU/AU]; Lipotek Pty Ltd, Inno-

vations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200 (AU). **PRICE, Jason** [AU/AU]; Lipotek Pty Ltd, Innovations Building, 124 Eggleston Road, Acton, Australian Capital Territory 0200 (AU).

(74) Agents: **FURLONG, Isla, Jane et al.**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property CN925.1, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

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

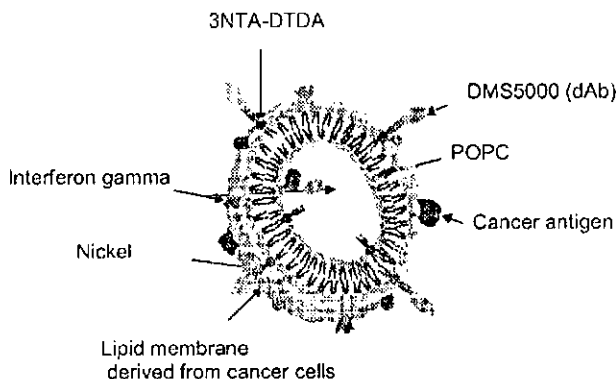
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,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

Declarations under Rule 4.17:

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITION FOR TARGETING DENDRITIC CELLS

FIGURE 1



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for targeting dendritic cells. In particular, the present invention relates to a composition comprising: a) one or more antigens; b) an anti-DC-SIGN immunoglobulin single variable domain; and c) a carrier which carries a) and b). The invention further relates to formulations, compositions and devices comprising such anti-DC-SIGN molecules and their use as a medicament and in the treatment of cancer, suitably melanoma.



-
- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> — as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) — as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) — of inventorship (Rule 4.17(iv)) | <p>Published:</p> <ul style="list-style-type: none"> — with international search report (Art. 21(3)) — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h)) — with sequence listing part of description (Rule 5.2(a)) |
|--|---|

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2009/063656

International filing date (day/month/year)
19.10.2009

Priority date (day/month/year)
21.10.2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K9/127 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04

Applicant
DOMANTIS LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Morawetz, Renate

Telephone No. +49 89 2399-8155



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/063656

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2009/063656

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>none</u>
	No: Claims	<u>1-29</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/063656

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Cited documents

Reference is made to the documents cited in the international search report:

- D1: WO 2005/018610 A (LIPOTEK PTY LTD [AU]; ALTIN JOSEPH [AU];
PARISH CHRISTOPHER RICHARD [A] 3 March 2005 (2005-03-03)
- D2: VAN BROEKHOVEN CHRISTINA L ET AL., CANCER RESEARCH,
AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE,
MD., US, vol. 64, no. 12, 15 June 2004 (2004-06-15), pages 4357-4365
- D3: KRETZ-ROMMEL ANKE ET AL., JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY,
LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 30,
no. 7, 1 October 2007 (2007-10-01), pages
- D4: TACKEN PAUL J ET AL., BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF
HEMATOLOGY, US, vol. 106, no. 4, 15 August 2005 (2005-08-15), pages
1278-1285
- D5: TACKEN P J ET AL., IMMUNOBIOLOGY, URBAN UND FISCHER
VERLAG, DE, vol. 211, no. 6-8, 14 September 2006 (2006-09-14), pages
599-608
- D6: HOLT L J ET AL., TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER
PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003
(2003-11-01), pages 484-490
- D7: DEMAREST STEPHEN J ET AL., CURRENT OPINION IN DRUG
DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB,
vol. 11, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 675-687
- D8: WO 2005/035572 A (DOMANTIS LTD [GB]; TOMLINSON IAN [GB];
BASRAN AMRIK [GB]; JONES PHILIP) 21 April 2005 (2005-04-21)
- D9: MAHNKE KARSTEN ET AL., CANCER RESEARCH, AMERICAN
ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD., US, vol.
65, no. 15, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 7007-7012
- D10: HERSEY PETER ET AL., JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY :
OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL
ONCOLOGY 15 OCT 2002, vol. 20, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15),

pages 4181-4190

2. The present invention relates to a composition for targeting dendritic cells comprising: a) one or more antigens; b) an anti-DC-SIGN immunoglobulin single variable domain; and c) a carrier which carries a) and b).
3. The subject-matter of claims 1-29 appears to be new in view of the available prior art (Article 33(2) PCT).
4. Inventive step

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-29 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1 and discloses (page 3, lines 9-16) a composition for modulating immunity by the in vivo targeting of an antigen to dendritic cells, the composition comprising: a preparation of antigen-containing membrane vesicles or antigen-containing liposomes having on the surface thereof a plurality of metal chelating groups; and a ligand for a receptor on said dendritic cells, said ligand being linked to a said metal chelating group via a metal affinity tag on said ligand; wherein, said antigen-containing vesicles or liposomes include an immunomodulatory factor.

The subject-matter of claim 1 therefore differs from this known composition in that it comprises an anti-DC-SIGN immunoglobulin single variable domain.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of an alternative composition for in vivo targeting of an antigen to dendritic cells.

The solution proposed in claim 1 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons.

D1 already proposes to use an anti DC-SIGN (CD209) antibody which can be a

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/063656

domain antibody for targeting the composition to dendritic cells (page 8, line 32 - page 9, line 4, claims 5, 19 and 21). No inventive step can, thus, be acknowledged for the subject-matter of claim 1.

D1 likewise discloses a method for making the composition and its use for the treatment of melanoma (page 3, lines 17-29; page 10, lines 8-12; claims 11, 27). The independent claims 19, 23, 24, 27 are therefore also considered not inventive.

Dependent claims 2-18, 20-22, 25, 26 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step either.

D1 already discloses the use of an immunomodulatory factor (page 9, lines 28-31; claim 1); one or more tumor antigens derived from membrane vesicles (page 8, lines 6-18; page 11, line 11 - page 12, line 8; page 16, lines 1-14; Figure 1; Example 1); use of (NTA)₃-DTDA (page 8, lines 19 - 31).

D2, like D1 discloses the targeting of dendritic cells with antigen-containing liposomes comprising NTA₃-DTDA and in addition discloses the use of nickel sulphate (page 4357, right hand column, last paragraph).

The MM200 melanoma cells and tumour antigens expressed by it are known from D10 (abstract; page 4188, right hand column, second paragraph).

In the absence of any information in the application as originally filed regarding any surprising properties of the anti-DC-SIGN immunoglobulin single variable domain comprising SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 3 (DMS5000) no inventive step can be acknowledged for claims 10, 28, 29 either.

For the sake of completeness it is noted that claims 1-29 are also considered to lack an inventive step in view of any of D3, D4, D5 in combination with D6 or D7.

COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una composición para dirigirse a las células dendríticas. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende: a) uno o más antígenos; b) un solo dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN; y c) un vehículo que es portador de a) y b). La invención se
10 refiere además a formulaciones, composiciones, y dispositivos que comprenden estas moléculas anti-DC-SIGN, y su uso como un medicamento, y en el tratamiento de cáncer, adecuadamente melanoma.

15

SECTOR: Preparaciones medicinales que contienen antígenos o anticuerpos y que actúan como agentes antineoplásicos.

20

25

COMPOSICIÓN PARA DIRIGIRSE A LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

La presente invención se refiere a una composición para dirigirse a las células dendríticas. En particular, la presente invención se refiere a una composición para vacunación, la cual comprende vesículas de membrana que comprenden antígenos y moléculas que se dirigen hacia las células dendríticas. De una manera adecuada, las moléculas que se dirigen hacia las células dendríticas son moléculas que se enlazan a DC-SIGN. La invención se refiere además a los usos, formulaciones, composiciones y dispositivos que comprenden estas moléculas anti-DC-SIGN.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El melanoma maligno es responsable del 79 por ciento de las muertes relacionadas con cáncer de piel, a pesar del hecho de que cuenta solamente por el 4 por ciento de todos los cánceres de piel [1]. Australia y Nueva Zelanda tienen el índice más alto de incidencia y mortalidad por melanoma, y se reporta que se está elevando su aparición [2].

El melanoma maligno se presenta a partir de las mutaciones en las células productoras de melanina, los melanocitos. Debido a que los melanocitos se encuentran en su mayor parte en la capa epidérmica de la piel, ésta es en consecuencia el lugar más común para las lesiones de melanoma primarias [3]. También se pueden presentar lesiones primarias en sitios no cutáneos en donde se encuentren los melanocitos, tales como la mucosa oral, nasofaringe,

senos paranasales, árbol traqueobronquial, vulva, vagina, ano, tracto urinario, sistema nervioso central, y ojos [4]. Se utiliza un sistema en etapas para medir el grado y la gravedad de la enfermedad, el cual se basa en la examinación del tumor primario y del grado de la extensión. Debido a que no se han identificado marcadores sanguíneos confiables para los propósitos de rastreo, el diagnóstico se apoya en las mediciones obtenidas a través de la examinación física y las técnicas de radiología. Estas mediciones se utilizan para determinar el desarrollo global (Etapa 0 a Etapa IV) y el pronóstico del paciente. Las primeras etapas (0, I y II) no muestran extensión del tumor primario y tienen muy buen pronóstico. Estas primeras etapas se diferencian principalmente basándose en la profundidad del tumor invasor. Cuando el tumor primario se ha metastatizado hasta las glándulas linfáticas o el tejido circundante, pero no hasta un ganglio linfático u otro órgano distante, se diagnostica que el paciente está en la Etapa III. Cuando el melanoma se ha extendido hasta los órganos distantes o hasta las glándulas linfáticas distantes, se diagnostica la Etapa IV de la enfermedad [5]. Debido a que las primeras etapas del melanoma en general no presentan síntomas, para el momento que se diagnostica el cáncer en un paciente, en general ya está en etapas avanzadas (Etapas III o IV), y en consecuencias, el pronóstico es pobre.

La detección oportuna del melanoma cutáneo, seguida por una intervención apropiada, tiene el mayor impacto sobre el pronóstico de los pacientes con melanoma. Cuando se detecta en las Etapas 0 a

II, el tratamiento recomendado es remover el tumor primario, la piel, y la carne de alrededor del tumor primario mediante cirugía. Cuando se reconoce la condición oportunamente en su curso, y se remueve quirúrgicamente el tumor primario, el 97 por ciento de los pacientes no muestran recurrencia alguna del problema. Debido a que los tumores incompletamente escindidos tienen un alto índice de recurrencia, y debido a que los pacientes con lesiones recurrentes tienen índices más bajos de cura a largo plazo, es importante remover el tumor entero [6]. La profundidad de invasión del tumor en el momento del diagnóstico predice con mayor precisión la supervivencia a partir del melanoma: el índice de supervivencia asociado con el melanoma está inversamente relacionado con su profundidad en el momento del diagnóstico. Cuando el melanoma primario ha invadido más profundamente, se conduce una biopsia del ganglio centinela para evaluar más precisamente la enfermedad, y para ayudar a determinar la necesidad de un tratamiento adicional.

Cuando se diagnostican las etapas más tardías (III y IV), las opciones de tratamiento que existen para el melanoma maligno son insatisfactorias, y la supervivencia a largo plazo de los pacientes con melanoma metastásico es un suceso relativamente raro [7]. Para los pacientes en la Etapa III, en general se remueve el ganglio linfático que rodea al ganglio que se prueba como positivo para melanoma. Cuando los pacientes son médicamente inadecuados para la cirugía o tienen la enfermedad no reseccionable debido a que es demasiado extensa, se puede utilizar radioterapia como una alternativa para la

cirugía. También se considera la radioterapia después de la operación en los pacientes que sean positivos o que tengan márgenes cercanos en seguida de la cirugía, o en donde la metástasis hacia los ganglios linfáticos presente el riesgo de una presentación regional [8]. Para el melanoma en la Etapa IV, el tratamiento convencional es la quimioterapia utilizando dacarbazina (DTIC) [9]. Otros fármacos de quimioterapia, tales como lomustina y fotemustina también están aprobados para el melanoma en la Etapa IV [10].

10 Dos terapias biológicas han recibido la aprobación de la FDA para utilizarse en el tratamiento de los pacientes con melanoma de alto riesgo: interferón alfa-2b e IL-2. El interferón alfa-2b se prescribe como una terapia adyuvante para alterar la historia natural de la enfermedad, y en algunos estudios ha mostrado que disminuye
15 los índices de recurrencia en los pacientes con melanoma maligno de alto riesgo completamente resecionado [H]. El tratamiento, sin embargo, requiere de una administración repetida durante un período de 52 semanas, la cual está asociada con toxicidades significativas y con un costo considerable [12]. La IL-2 es un agente
20 inmunoterapéutico utilizado para los pacientes con melanoma metastásico, y está asociado con un índice bajo pero consistente de respuesta global de aproximadamente el 13 al 17 por ciento (respuesta parcial del 7 al 9 por ciento, y respuesta completa del 6 al 8 por ciento) [13, 14].

25 El melanoma es un cáncer inmunogénico. Con frecuencia se

encuentran grandes números de linfocitos infiltrantes de tumores naturalmente en los pacientes con melanoma, y muchos estudios han reportado que las células de melanoma expresan antígenos que pueden inducir respuestas de células-T y de anticuerpos específicas del melanoma [15]. Esto ha conducido al diseño de diferentes estrategias de vacunas para melanoma, algunas de las cuales están compuestas de células enteras, lisados celulares, proteínas, y otros de los péptidos específicos. También se han probado las vacunas basadas en células dendríticas que utilizan células dendríticas (DCs) cargadas con antígeno ex-vivo, con el objeto de mejorar la respuesta inmunitaria del paciente al tumor. Sin embargo, a pesar de más de 15 años de estudios, ninguno ha sido todavía aprobado para utilizarse fuera de un estudio clínico [16].

De conformidad con lo anterior, sigue existiendo una necesidad de un tratamiento efectivo para el melanoma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende:

- a) uno o más antígenos;
- b) un solo dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN; y
- c) un vehículo, el cual es portador de a) y b).

En una modalidad, la composición comprende además, d) un factor inmunomodulador. Los factores inmunomoduladores adecuados se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional

Número WO 2005/018610. Los factores inmunomoduladores adecuados también se pueden describir como "señales de peligro".

En una modalidad, uno o más antígenos se derivan a partir de vesículas de membrana (MVs). De una manera adecuada, las vesículas de membrana comprenden uno o más antígenos asociados con membrana, adecuadamente, antígenos tumorales, incluyendo los antígenos de diferenciación de melanoma de tirosinasa, gp100, y MART-1, o los antígenos de cáncer de testículos MAGE-A3, MAGE A-10, BAGE, GAGE, y XAGE.

En otra modalidad, el uno o más antígenos se pueden derivar a partir de cualquier polipéptido para el cual pueda ser deseable la presentación sobre una célula dendrítica.

En una modalidad, las vesículas de membrana se derivan a partir de células tumorales, de preferencia células de melanoma. Están disponibles un número de líneas celulares de melanoma. En una modalidad, se utilizan células de melanoma derivadas a partir de la línea celular de melanoma MM200. En otra modalidad, las células de melanoma se pueden obtener a partir de un paciente. En una modalidad, el paciente es un paciente con melanoma maligno. En otra modalidad, las células tumorales pueden ser una línea celular o las células del paciente derivadas a partir de cualquier forma de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, mama, pulmón (incluyendo carcinoma pulmonar no microcelular (NSCLC)), hígado, seminomas y/o cáncer de cabeza y cuello.

En otra modalidad, el único dominio variable de

inmunoglobulina anti-DC-SIGN es un anticuerpo de un solo dominio (dAb), de una manera adecuada un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (dAb) de la cadena pesada, tal como un fragmento de dAb V_H . En otra modalidad, el único dominio variable de
5 inmunoglobulina anti-DC-SIGN es un fragmento de anticuerpo de un solo dominio (dAb) de la cadena ligera, tal como un fragmento de dAb V_L . En una modalidad, el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN comprende el anticuerpo de un solo dominio específico, identificado en la presente como DMS5000, el
10 cual comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 1 de la Figura 12. En otra modalidad, el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es DMS5000 que tiene una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 1 de la Figura 12. En otra modalidad, el único dominio variable de
15 inmunoglobulina anti-DC-SIGN comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 3. En una modalidad adicional, el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es uno que tiene la misma especificidad de enlace que el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN que tiene una
20 secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 3. En otra modalidad, el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es uno que tiene las mismas secuencias de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO:
25 1 ó 3.

El único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN puede comprender además una cola C-terminal de polihistidina. Por ejemplo, el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN puede comprender la secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 2 de la Figura 12. Esta cola C-terminal de polihistidina hace posible atar el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN por medio de la cola a las vesículas de membrana utilizando el lípido quelante 3NTA-DTDA.

Los vehículos adecuados incluyen cualquier método de suministro adecuado, tal como microcápsulas biodegradables o complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), cocleatos, liposomas, vectores vivos atenuados genéticamente diseñados, tales como virus o bacterias, y partículas tipo virus (quiméricas) recombinantes, por ejemplo, Bluetongue. Otros sistemas portadores en los seres humanos pueden incluir cápsulas de liberación entérica que protejan al antígeno del medio ambiente ácido del estómago y microesferas de poli-láctido-glicólido. Los diluyentes adecuados son NaHCO_3 0.2 N y/o solución salina. En una modalidad, el vehículo es un liposoma. De una manera adecuada, el liposoma comprende constituyentes liposomales. Estos constituyentes liposomales hacen posible la formación de liposomas.

Los constituyentes liposomales se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 2005/018610.

De conformidad con lo anterior, en otra modalidad, los constituyentes liposomales comprenden el lípido quelante 3-(ácido

nitrilo-triacético)-ditetradecil-amina (3NTA-DTDA). En una modalidad adicional, los constituyentes liposomales también comprenden níquel, de preferencia en la forma de sulfato de níquel (NiSO_4). El NiSO_4 facilita la interacción de la cola C-terminal de polihistidina con
5 el lípido quelante 3NTA-DTDA.

En otra modalidad, los constituyentes liposomales comprenden el lípido de α -palmitoil- β -oleoil-fosfatidil-colina (POPC)). En una modalidad, los constituyentes liposomales pueden incorporar un polímero hidrofílico, tal como polietilenglicol (PEG), con el objeto de
10 prolongar la presencia de los liposomas en la circulación *in vivo*.

En otra modalidad, el factor inmunomodulador es una citoquina que estimula las células dendríticas (DC). De una manera adecuada, el factor inmunomodulador es la citoquina de interferón gamma (IFN-gamma). Otros factores inmunomoduladores incluyen interleucina-2,
15 interleucina-4, interleucina-10, interleucina-12, y factor de crecimiento transformante- β .

En una modalidad, la composición es una composición de vacuna. En una modalidad, la composición de vacuna es "Lipovaxina-MM" como se describe en la presente.

20 En otra modalidad, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. De una manera adecuada, la composición se prepara para su administración intravenosa.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la elaboración de una composición de acuerdo con la invención, el cual
25 comprende:

- i) preparar vesículas de membrana;
- ii) preparar el constituyente liposomal;
- iii) combinar las vesículas de membrana y el constituyente liposomal con el factor inmunomodulador;
- 5 iv) agregar el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN.

En una modalidad, los pasos para un método se pueden llevar a cabo en cualquier orden. En una modalidad, la preparación de las vesículas de membrana es mediante la propagación de las células tumorales, sonicación y preparación de los gránulos de membrana mediante centrifugación y resuspensión en suero regulado con fosfato. En otra modalidad, el constituyente liposomal se prepara mediante la mezcla de POPC y Ni-3NTA-DTDA. En una modalidad adicional, el método comprende además complementar con níquel.

15 En otro aspecto, se proporciona una composición de acuerdo con la invención para utilizarse como un medicamento. En un aspecto, la composición de acuerdo con la invención es para utilizarse en el tratamiento de cáncer. De una manera adecuada, el cáncer es melanoma. En otra modalidad, la composición es para administración intravenosa.

20 En otro aspecto, se proporciona un método para el tratamiento de un tumor en un sujeto, el cual comprende administrar una composición de acuerdo con la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 FIGURA 1. Representación diagramática de Lipovaxina-MM,

que muestra los lípidos derivados a partir de la fracción de membrana MM200; son visibles POPC y diferentes antígenos de cáncer. También se ilustra el anticuerpo de dominio (dAb) con dirección hacia la célula dendrítica DMS5000. El interferón gamma se ilustra como principalmente asociado con la superficie externa de la vacuna.

FIGURA 2. La cantidad creciente de 3NTA-DTDA en los liposomas, y la proporción molar correspondiente de dAb, no aumenta el efecto de dirección de la Lipovaxina-MM. Las células THP-1 que expresaban el DC-SIGN humano se incubaron con un anticuerpo monoclonal humano anti-DC-SIGN o con Lipovaxina-MM que contenía diferentes cantidades de 3NTA-DTDA y el dAb injertado. La Figura 2 muestra, mediante el análisis FACS, que el número creciente de moléculas de dirección sobre la superficie de la Lipovaxina-MM no aumentó la dirección de la vacuna.

FIGURA 3. Secciones-Z a través de una célula dendrítica derivada de monocitos humanos (moDC) incubada con Lipovaxina-MM. La vacuna se hizo a partir de POPC, 3NTA-DTDA y vesículas de membrana MM200 que incorporaban el tinte fluorescente BODIPY-500-510-C (verde), y se injertó con el dAb DMS5000. Las moDCs se tiñeron con succinimidil-éster rojo BODIPY (rojo), y se incubaron con la vacuna durante 5 horas antes de la microscopía. Las células se colocaron sobre cubreobjetos inmediatamente antes de la observación bajo el microscopio confocal. Las secciones-Z muestran que la vacuna se enlaza con la superficie de la moDC (primera y

cuarta imágenes), y que se lleva hacia dentro de la célula (segunda y tercera imágenes).

FIGURA 4. Ensayo de injerto. Las fusiones de liposomas/vesículas de membrana (MV) y Lipovaxina-MM (con dAb injertado) se incubaron con Proteína A-Biotina, seguida por estreptavidina conjugada con el fluorocromo AlexaFluor488. El análisis mediante citometría de flujo demostró que solamente las partículas que tienen dAb injertado (lado derecho) son capaces de enlazarse al fluorocromo.

FIGURA 5. Enlace de Lipovaxina-MM fluorescina a las células humanas y a las líneas celulares transfectadas. Se evaluaron las células THP-1, las células THP-1 transfectadas que expresaban el DC-SIGN humano (THP-1/DC-SIGN), las células humanas mononucleares de sangre periférica (PBMCs), y las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDCs) para determinar la expresión de DC-SIGN, y su capacidad para enlazarse a la Lipovaxina-MM fluorescina. Solamente las células THP-1/DC-SIGN y las moDCs expresaron el DC-SIGN, y fueron capaces de enlazarse a la Lipovaxina-MM.

FIGURA 6. Cuantificación de la actividad de IFN-gamma asociada con Lipovaxina-MM. La actividad de IFN-gamma de la Lipovaxina-MM se midió basándose en la expresión de CD64 sobre las células THP-1/DC-SIGN. Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con diferentes concentraciones de ya sea la Lipovaxina-MM fresca, o bien la Lipovaxina-MM de donde se removió

el IFN-gamma no incorporado mediante centrifugación (Lipovaxina-MM asociada con membrana). la sobre-regulación de CD64 se midió mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD64. Los resultados se muestran como el promedio + error estándar.

FIGURA 7. Análisis Western Blot de las Vesículas de Membrana MM200. Los lisados celulares se prepararon mediante sonicación; las vesículas de membrana (MVs) se prepararon de acuerdo con los procedimientos operativos convencionales, como se describe en la presente. Entonces se midió el contenido de proteína de las muestras; las muestras se hirvieron con regulador de muestras, se cargaron sobre geles NuSep previamente vaciados (del 4 al 20 por ciento), y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa y se bloquearon durante la noche. Las membranas se sondearon con el anticuerpo primario, se lavaron, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. Las bandas se visualizaron utilizando el sustrato estabilizado con Azul Western de Promega. Las Pan cadherina, Melan A, y gp100 se visualizaron tanto en los lisados celulares (izquierda), como en las vesículas de membrana (MVs) (derecha) preparadas a partir de las células MM200.

FIGURA 8. Estabilidad de Lipovaxina almacenada a 4°C: Efecto sobre el enlace de Lipovaxina-MM (LV-MM) a DC-SIGN *in vitro*. La LV-MM se almacenó a 4°C, y se llevaron a cabo los ensayos de enlace utilizando las células THP-1/DC-SIGN sobre las alícuotas

tomadas en diferentes puntos del tiempo. La LV-MM se fluorescentó con el tinte BODIPY-500-510-C. Después de un almacenamiento durante 4 semanas a 4°C, la LV-MM fue estable con respecto al enlace con DC-SIGN sobre las células THP-1/DCSIGN.

5 FIGURA 9. Estabilidad de Lipovaxina (LV-MM) almacenada a 4°C: Efecto sobre la actividad de IFN-gamma. La actividad de IFN-gamma en LV-MM fresca y en LV-MM almacenada a 4°C se midió basándose en la expresión de CD64 sobre las células THP-1/DCSIGN. La gráfica de la izquierda representa la LV-MM entera, 10 mientras que aquélla de la derecha representa la LV-MM con el IFN-gamma no asociado con membrana removido mediante centrifugación. Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con diferentes concentraciones de LV-MM. La sobre-regulación de CD64 se midió mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo 15 monoclonal (mAb) anti-CD64. Los resultados se muestran como el promedio + error estándar. Después de un almacenamiento a 4°C, el IFN-gamma en la LV-MM fue estable durante hasta 4 semanas. Sin embargo, una reducción en el IFN-gamma enlazado con membrana en la LV-MM indica que el IFN-gamma llega a disociarse de la 20 membrana a través del tiempo.

FIGURA 10. Secreción de IFN-gamma y TNF-alfa por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) cultivadas a partir de macacos vacunados con Lipovaxina-MM. Dos grupos (A y B) de 4 macacos se vacunaron con Lipovaxina-MM de acuerdo con el 25 programa ilustrado más adelante. Se tomó sangre en diferentes

tiempos durante el programa de vacunación, y las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron y se cultivaron durante 48 horas con Lipovaxina-MM "simulada" (que carecía de IFN-gamma) (con DLV), anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD₃ (CD₃), o ningún estímulo (sin DLV). Los sobrenadantes del cultivo se recolectaron y se analizaron para determinar la producción de IFN-gamma y TNF-alfa utilizando el Kit de Citoquina Th1/Th2 de Primate No humano BD CBA. SN = Sobrenadante.

FIGURA 11. Producción de anticuerpos en macacos vacunados con Lipovaxina-MM. Dos grupos (A y B) de 4 macacos se vacunaron con Lipovaxina-MM de acuerdo con el programa ilustrado más adelante. Se tomó sangre en diferentes tiempos durante el programa de vacunación, y se llevaron a cabo los análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas para medir la producción de anticuerpos específicos para la Lipovaxina-MM entera (Lipovaxina), el componente de vesícula de membrana MM200 de la Lipovaxina-MM (MV), y el anticuerpo de dominio DMS5000 (dAb).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En esta memoria descriptiva se ha descrito la invención con referencia a las modalidades, de una manera que hace posible que se escriba una memoria descriptiva clara y concisa. Se pretende y se debe apreciar que las modalidades se pueden combinar diversamente o se pueden separar sin apartarse de la invención.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo

significado que es entendido comúnmente por un experto ordinario en este campo (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación, y bioquímica). Se emplean técnicas convencionales para los métodos moleculares, genéticos, y bioquímicos (véase, en términos generales, Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. y Ausubel y colaboradores, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., las cuales se incorporan a la presente como referencia), y métodos químicos.

Los antígenos para utilizarse en las composiciones de la presente invención incluyen antígenos tumorales. De una manera adecuada, estos antígenos pueden incluir cualesquiera antígenos que se expresen diferencialmente en las células tumorales, comparándose con las células no tumorales derivadas a partir del mismo tejido. La expresión diferencial puede incluir, por ejemplo, una sobre-regulación, de una manera alternativa, las formas empalmadas, etc. Los antígenos tumorales incluyen los denominados como antígenos de cáncer/testículos. Éstos son antígenos/proteínas que en general no se expresan en los tejidos/células normales diferentes de los testículos. Sin embargo, se piensa que estos antígenos se expresan específicamente en ciertos cánceres/tumores, tales como vejiga, mama, pulmón, en particular cáncer pulmonar no microcelular (NSCLC), hígado, seminomas, melanoma, y/o cánceres de cabeza y cuello, y convenientemente pueden ser reconocidos por

las células-T citotóxicas. Hasta ahora se han descrito más de 50 antígenos de cáncer/testículos y, para muchos de ellos, se han identificado epítomos específicos reconocidos por los linfocitos-T. En una modalidad de la invención, el uno o más antígenos pueden ser cualquier antígeno de cáncer/testículos.

Una familia de antígenos de cáncer/testículos bien caracterizada es la familia MAGE, la cual incluye 12 genes estrechamente relacionados, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE 12, localizados sobre el cromosoma X, y que comparten unos con otros del 64 al 85 por ciento de homología en su secuencia de codificación (De Plaen, Immunogenetics 1994, 40: 5 (360-369)). Éstos son algunas veces conocidos como MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12 (La familia MAGE). Otros dos grupos de proteínas también son parte de la familia MAGE, aunque están más distantemente relacionados. Éstos son los grupos MAGE B y MAGE C. La familia MAGE B incluye MAGE B1 (también conocido como MAGE Xp1 y DAM 10), MAGE B2 (también conocido como MAGE Xp2 y DAM 6) MAGE B3 y MAGE B4 - la familia MAGE C actualmente incluye MAGE C1 y MAGE C2.

En una modalidad, los antígenos para utilizarse en la composición de la presente invención son antígenos de melanoma. Los antígenos de melanoma adecuados son aquéllos que son reconocidos por las células-T, incluyendo los antígenos de cáncer/

testículos, tales como MAGE-1 y MAGE-3. Estos antígenos también se producen en otros tumores. Por ejemplo, MAGE-3 se encuentra en el carcinoma pulmonar microcelular (SCLC), carcinoma pulmonar no microcelular (no-SCLC), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), cáncer de colon, y cáncer de mama. MAGE-1
 5 también se produce en el cáncer de mama, glioblastoma, neuroblastoma, carcinoma pulmonar microcelular (SCLC), y cáncer medular de la tiroides. Otros antígenos de melanoma incluyen los antígenos de diferenciación específicos del linaje de los melanocitos, incluyendo MART-1/Melan-A, tirosinasa, GP75, y GP100. Otros
 10 antígenos adecuados incluyen tirosinasa, BAGE, GAGE-1,2, GnT-V, p15. En adición, se incluyen los antígenos mutados específicos de tumor, tales como β -catenina, MUM-1 y CDK4.

La no integrina de sujeción de ICAM-3 específica de las células
 15 dendríticas (DC-SIGN o CD209) es una proteína de membrana tipo II que es lectina (tipo-C) dependiente de calcio específica de manosa.

DC-SIGN media las interacciones entre las células dendríticas (DCs) y las células-T, y es descrita, por ejemplo, por Soilleux, Clinical Science (2003), 104, 437-446, dándose los datos de
 20 secuencia en NM_021155 (ARNm) y NP 066978 (proteína).

De una manera adecuada, el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN de la invención se puede presentar en cualquier formato de anticuerpo.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo se refiere a IgG,
 25 IgM, IgA, IgD o IgE, o a un fragmento (tal como un Fab, F(ab')₂, Fv,

Fv enlazado por disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv enlazado por disulfuro, diacuerpo) ya sea derivado a partir de cualquier especie que produzca naturalmente un anticuerpo, o bien creado mediante tecnología de ADN recombinante; ya sea aislado a partir de suero, células-B, hibridomas, transfectomas, levadura, o bacterias.

Como se utiliza en la presente, "formato de anticuerpo" se refiere a cualquier estructura de polipéptido adecuada en donde se pueden incorporar uno o más dominios variables de anticuerpos para conferir especificidad de enlace para el antígeno sobre la estructura. Una variedad de formatos de anticuerpos adecuados son conocidos en la materia, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de anticuerpos, fragmentos de enlace de antígeno de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo, Fv de una sola cadena (scFv), un Fv enlazado por disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂), un solo dominio variable de anticuerpo (por ejemplo, un dAb, V_H, V_{HH}, V_L), y las versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificadas mediante la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado, o una V_{HH} humanizada).

La frase "único dominio variable de inmunoglobulina" se refiere

a un dominio variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que se enlaza específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones o dominios V . Un único dominio variable de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, 5 homo- o hetero-multímero) con otras regiones variables o dominios variables en donde las otras regiones o dominios no son requeridos para el enlace de antígeno por el único dominio variable de inmunoglobulina (es decir, en donde el único dominio variable de inmunoglobulina se enlaza a un antígeno independientemente de los 10 dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "único dominio variable de inmunoglobulina" como se utiliza el término en la presente. Un "único dominio variable de inmunoglobulina" es lo mismo que un "dominio variable de inmunoglobulina único" como se utiliza el término en la presente. Un 15 "único dominio variable de anticuerpo" o un "dominio variable de anticuerpo único" es lo mismo que un "único dominio variable de inmunoglobulina" como se utiliza el término en la presente. Un único dominio variable de inmunoglobulina, en una modalidad, es un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye los 20 únicos dominios variables de anticuerpos a partir de otras especies, tales como dAbs V_{HH} de roedor (por ejemplo, como se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO 00/29004, el contenido de la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad), tiburón nodriza, y camélido. V_{HH} de camélido son 25 polipéptidos del único dominio variable de inmunoglobulina que se

derivan a partir de las especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario, y guanaco, los cuales producen anticuerpos de la cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. La V_{HH} se puede humanizar.

5 Un "dominio" es una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En términos generales, los dominios son responsables de las propiedades funcionales separadas de las proteínas, y en muchos casos se pueden agregar, remover o transferir a otras proteínas sin
10 pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "único dominio variable de anticuerpo" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de los dominios variables de anticuerpos. Por consiguiente, incluye los dominios variables de anticuerpos completos y los dominios variables modificados, por
15 ejemplo, en donde uno o más ciclos han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpos, o los dominios variables de anticuerpos que han truncado o que comprenden extensiones N- o C-terminales, así como fragmentos plegados de los dominios variables que conservan
20 cuando menos la actividad de enlace y la especificidad del dominio de longitud completa.

 El enlace específico de una proteína de enlace de antígeno (especificidad de enlace), tal como un dAb, a un antígeno o epítipo, se puede determinar mediante cualquier ensayo adecuado,
25 incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de enlace

competitivo, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos, tales como ELISA, y ensayos de competencia de emparejado, y las diferentes variantes de los mismos.

Regiones determinantes de complementariedad (CDRs), y
5 regiones de estructura son las regiones de un dominio variable de inmunoglobulina. En particular hay regiones de la secuencia de un único dominio variable de anticuerpo que exhiben una variabilidad particular, es decir, las secuencias de la CDR (región determinante de complementariedad). Las regiones determinantes de
10 complementariedad (CDRs) están en posiciones definidas dentro de la secuencia del dominio variable de anticuerpo. Un número de sistemas para definir las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de una secuencia serán familiares para los expertos en este campo. En una modalidad, las secuencias de las
15 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la presente invención son como se definen en la Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest (Base de Datos de Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico) de Kabat (Kabat E.A., Wu, T.T., Perry, H., Gottesman, K. y Foeller, C. (1991)
20 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. NIH Publicación No. 91-3242), la cual da un esquema de numeración estándar para numerar los residuos en un anticuerpo de una manera consistente. Los únicos dominios variables de inmunoglobulina (dAbs) descritos en la presente contienen regiones determinantes de
25 complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3).

Las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3) de los dAbs V_H (CDRH1 etc.), y V_L (CDRL1 etc.) (V_k), descritos en la presente, serán fácilmente evidentes para la persona experta en este campo, basándose en el sistema de numeración de aminoácidos de Kabat bien conocido, y en la definición de las regiones determinantes de complementariedad. De acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, el método más comúnmente empleado basándose en la variabilidad de la secuencia, las CDR-H3 de la cadena pesada tienen diferentes longitudes, y las inserciones se numeran entre los residuos H100 y H101 con letras hasta K (es decir, H100, H100A .. H100K, H101). Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se pueden determinar de una manera alternativa utilizando el sistema de Chotia (basado en la localización de las regiones de ciclo estructurales) (Chotia y colaboradores (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342 (6252), páginas 877-883), de acuerdo con AbM (compromiso entre Kabat y Chotia) o de acuerdo con el método Contact (basado en las estructuras del cristal en la predicción de los residuos de contacto con el antígeno) como sigue. Véase <http://www.bioinf.org.uk/abs/> para conocer los métodos adecuados para determinar las regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

Una vez que se ha numerado cada residuo, entonces se pueden aplicar las siguientes definiciones de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs):

Kabat :

CDR H1: 31-35/35A/35B

CDR H2: 50-65

CDR H3: 95-102

5 CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

CDR L3: 89-97

Chotia:

10 CDR H1: 26-32

CDR H2: 52-56

CDR H3: 95-102

CDR L1: 24-34

CDR L2: 50-56

15 CDR L3: 89-97

AbM:

(Usando la numeración de Kabat): (Usando la numeración de Chotia):

	CDR H1:	26-35/35A/35B	26-35
20	CDR H2:	50-58	- - -
	CDR H3:	95-102	- - -
	CDR L1:	24-34	- - -
	CDR L2:	50-56	- - -
	CDR L3:	89-97	- - -
25	Contact		

(Usando la numeración de Kabat): (Usando la numeración de Chotia):

	CDR H1:	30-35/35A/35B	30-35
	CDR H2:	47-58	- - -
	CDR H3:	93-101	- - -
5	CDR L1:	30-36	- - -
	CDR L2:	46-55	- - -
	CDR L3:	89-96	- - -

("-" significa la misma numeración que Kabat)

10 La presente invención proporciona una vacuna o composición farmacéutica que opcionalmente incluye además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

 En términos generales, la composición de la invención se utilizará en una forma purificada, junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, ya sea incluyendo una solución salina y/o un medio regulado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, y solución de Ringer lactatada. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo de polipéptido en suspensión, se pueden seleccionar a partir de viscosantes, tales como carboxi-metil-celulosa, polivinil-pirrolidona, gelatina, y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen rellenos de fluidos y nutrientes y rellenos de electrolitos, tales como aquéllos basados en dextrosa de Ringer. También puede haber conservadores y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes
5 quelantes y gases inertes presentes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición). Se pueden utilizar una variedad de formulaciones adecuadas, incluyendo las formulaciones de liberación prolongada.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar
10 como composiciones administradas por separado o en conjunto con otros agentes. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diferentes agentes citotóxicos u otros agentes en conjunto con la composición de la presente invención, o inclusive combinaciones de composiciones que tengan diferentes
15 especificidades, tales como composiciones que comprendan ligandos seleccionados utilizando diferentes antígenos o epítopos objetivo, o composiciones que comprendan diferentes factores inmuno-moduladores, ya sea que se reserven o no antes de su administración.

20 La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de aquéllas comúnmente conocidas por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo. Para la terapia, incluyendo sin limitación la inmunoterapia, las composiciones seleccionadas de la invención se
25 pueden administrar a cualquier paciente de acuerdo con las técnicas

convencionales.

La administración puede ser mediante cualquier modo apropiado, incluyendo parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente, por medio de la vía pulmonar, o también, de una manera apropiada, mediante infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerá de la edad, el sexo, y la condición del paciente, de la administración concurrente de otros fármacos, de las contra-indicaciones, y de otros parámetros que serán tomados en cuenta por el médico. La administración puede ser local (por ejemplo, suministro local al pulmón mediante administración pulmonar, por ejemplo, administración intranasal) o sistémica, como se indica.

Los únicos dominios variables de inmunoglobulina anti-DC-SIGN para utilizarse en la composición de la presente invención se pueden liofilizar para su almacenamiento, y se pueden reconstituir en un vehículo adecuado antes de usarse. Se ha demostrado que esta técnica es efectiva con la inmunoglobulinas convencionales, y se pueden emplear las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en este campo. Será apreciado por los expertos en la materia que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a diferentes grados de pérdida de actividad del anticuerpo (por ejemplo, con las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos de IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de IgG), y que los niveles de uso pueden tener que

ajustarse hacia arriba para compensarse.

La composición de la presente invención o un cóctel de la misma, se puede administrar para los tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad
5 adecuada para llevar a cabo cuando menos una inhibición parcial, supresión, modulación, aniquilación, o algún otro parámetro mensurable, de una población de células seleccionadas, se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades necesarias para alcanzar esta dosificación dependerán de la
10 gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunológico del paciente. Para las aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la presente composición o los cócteles de la misma, también se pueden administrar en dosificaciones similares o ligeramente más bajas, para prevenir, inhibir, o retardar
15 el establecimiento de la enfermedad (por ejemplo, para sostener la remisión o la pasividad, o para prevenir la fase aguda). El clínico experto podrá determinar el intervalo de dosificación apropiado para tratar, suprimir, o prevenir la enfermedad.

El tratamiento o la terapia que se lleva a cabo utilizando las
20 composiciones descritas en la presente se considera "efectiva" si se reducen uno o más síntomas (por ejemplo, por cuando menos el 10 por ciento o por cuando menos un punto en una escala de evaluación clínica), en relación con los síntomas presentes antes del tratamiento, o en relación con los síntomas en un individuo (humano
25 o un animal modelo) no tratado con dicha composición u otro control

adecuado. Los síntomas obviamente variarán dependiendo de la enfermedad o del trastorno dirigido, pero pueden ser medidos por un clínico o técnico ordinariamente experto. Estos síntomas se pueden medir, por ejemplo, mediante el monitoreo del nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o del trastorno (por ejemplo, los niveles de un enzima o metabolito correlacionado con la enfermedad, los números de células afectadas, etc.), mediante el monitoreo de las manifestaciones físicas (por ejemplo, inflamación, tamaño del tumor, etc.), o mediante una escala de evaluación clínica aceptada. Una reducción sostenida (por ejemplo, uno o más días, o más tiempo) en los síntomas de la enfermedad o del trastorno por cuando menos el 10 por ciento o por uno o más puntos en una escala clínica dada, indica un tratamiento "efectivo". De una manera similar, la profilaxis llevada a cabo utilizando una composición como se describe en la presente es "efectiva" si se retarda, se reduce, o se elimina el establecimiento o la gravedad de uno o más síntomas en relación con tales síntomas en un individuo similar (humano o modelo animal) no tratado con la composición.

Una composición de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en los establecimientos profiláctico y terapéutico para ayudar en la alteración, inactivación, aniquilación, o remoción de una población de células objetivo seleccionada en un mamífero.

La composición se puede administrar y/o formular junto con uno o más agentes terapéuticos o activos adicionales. Cuando una composición se administra con un agente terapéutico adicional, la

composición se puede administrar antes, simultáneamente con, o subsiguientemente a, la administración del agente adicional. En términos generales, la composición y el agente adicional se administran de una manera que proporcione un traslape del efecto terapéutico.

Como se utiliza en la presente, el término "dosis" se refiere a la cantidad de composición administrada a un sujeto todo a la vez (dosis unitaria), o en dos o más administraciones durante un intervalo de tiempo definido. Por ejemplo, la dosis puede referirse a la cantidad de la composición administrada a un sujeto durante el transcurso de un día (24 horas) (dosis diaria), dos días, una semana, dos semanas, tres semanas, o uno o más meses (por ejemplo, mediante una sola administración, o mediante dos o más administraciones). El intervalo entre dosis puede ser cualquier cantidad de tiempo deseada.

De una manera adecuada, la composición es para su administración a un paciente que padezca de cáncer y, en particular, melanoma, y para el tratamiento de ese paciente.

Como se utilizan en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a la prevención del establecimiento de la enfermedad o de un síntoma de la enfermedad, la inhibición del progreso de una enfermedad o de un síntoma de una enfermedad, o la reversión de la enfermedad o de un síntoma de la enfermedad.

La búsqueda de vacunas/inmunoterapias de melanoma efectivas se basa en el principio de que el sistema inmunológico se

puede manipular *de novo* mediante la vacunación terapéutica, con el objeto de reforzar la función inmunitaria endógena contra el cáncer, para romper la inmuno-tolerancia al cáncer, y para estimular la destrucción de las células tumorales [17]. Ahora se reconoce que las
5 células dendríticas (DCs) tienen una función central en la iniciación de las respuestas inmunitarias adaptables mediadas por las células-T que son importantes para la destrucción de tumores [18]. Las células dendríticas (DCs) son únicas en su capacidad para configurar la respuesta inmunitaria. Por una parte, son capaces de iniciar las
10 respuestas inmunitarias adaptables, mientras que por la otra parte, son responsables de mantener la tolerancia hacia los auto-antígenos. Cuál de los dos tipos de respuesta inmunitaria se inicie depende en gran parte de las señales recibidas por las células dendríticas (DCs) en el momento de la absorción del antígeno. Las estrategias de
15 vacunación para la inmunoterapia de cáncer — incluyendo melanoma — por consiguiente, se concentran en el suministro — *in vivo* y *ex vivo* — de los antígenos de cáncer a este subconjunto específico de células presentadoras de antígeno.

En una modalidad, la presente invención proporciona
20 Lipovaxina para el melanoma maligno (Lipovaxina-MM), la cual es una vacuna/inmunoterapia liposomal multivalente dirigida hacia las células dendríticas (DCs), contra el melanoma maligno. En esta modalidad, y como se describe en la presente, la vacuna se prepara a partir de seis componentes: vesículas de membrana (MVs)
25 preparadas a partir de células de melanoma MM200, el anticuerpo de

dominio (dAb) específico de DC-SIGN DMS5000, el lípido quelante de 3(ácido nitrilo-triacético)-ditetradecil-amina (3NTA-DTDA), el sulfato de níquel (NiSO_4), la citoquina de interferón gamma (IFN-gamma), y el lípido de α -palmitoil- β -oleoil-fosfatidil-colina (POPC).

5 La fracción de membrana de las células de melanoma MM200 forma vesículas de membrana (MVs) que llevan antígenos asociados con membrana, incluyendo los antígenos tumorales asociados con melanoma. DMS-5000, un fragmento de dAb V_H , reconoce el marcador de célula dendrítica (DC) humano DC-SIGN, y hace posible
10 el suministro específico de la vacuna a las células dendríticas (DCs). DMS5000 se ata, por medio de un cola C-terminal de polihistidina, a las vesículas de membrana, utilizando el lípido quelante 3NTA-DTDA, y esta interacción depende de la presencia de NiSO_4 . La inserción de 3NTA-DTDA en la membrana de las vesículas se mejora
15 mediante la inclusión del lípido portador POPC. La citoquina IFN-gamma proporciona la señal estimulante requerida para armar las células dendríticas (DCs) con el fin de llevar a cabo sus funciones efectoras necesarias.

 La Lipovaxina-MM es una vacuna/inmunoterapia liposomal para
20 el melanoma maligno que actúa dirigiendo específicamente su carga antigénica hacia el receptor de DC-SIGN sobre la superficie de las células dendríticas (DCs) humanas *in vivo*. DC-SIGN es un receptor endocítico, y el enlace de la vacuna al DC-SIGN conduce a la internalización del complejo de la vacuna-DC-SIGN por parte de la
25 célula dendrítica (DC). La vacuna también lleva la citoquina IFN-

gamma, que estimula la maduración de la célula dendrítica (DC). La Lipovaxina-MM, por consiguiente, se ha diseñado para hacer posible que la citoquina proporcione una señal estimulante a las células dendríticas (DCs) al mismo tiempo que las células dendríticas (DCs) reciben y procesan el material antigénico, proporcionando, por consiguiente, a las células dendríticas (DCs), una mayor oportunidad de iniciar las respuestas de células-T estimulantes específicas de la vacuna apropiadas. No se requiere manipulación alguna *ex vivo* de las células dendríticas (DCs) del paciente, lo cual es una ventaja significativa sobre las vacunas de melanoma dirigidas hacia las células dendríticas (DCs) existentes estudiadas hasta la fecha. El co-cultivo de las células dendríticas (DCs) humanas con Lipovaxina-MM *in vitro* conduce a la internalización de la vacuna y a la sobre-regulación de un número de marcadores de maduración de la célula dendrítica (DC), incluyendo CD64, CD40, CD86, CD80 y HLA-ABC y hasta un menor grado, HLA-DR.

La Lipovaxina-MM se dirige hacia una reserva de antígenos de melanoma, derivados a partir de la fracción de membrana derivada de células de melanoma, hacia las células dendríticas (DCs), mientras que al mismo tiempo, suministra una señal estimulante apropiada para asegurar la maduración óptima de las células dendríticas (DCs) objetivo. En la formulación descrita en la presente, la Lipovaxina-MM lleva marcadores de membrana de plasma generales, tales como Pan-cadherina, así como proteínas asociadas con melanoma. Se ha confirmado la presencia de cuando menos tres

de estas proteínas — gp100, tirosinasa, y MART-1 — en la vacuna. Probablemente también se presentan numerosos antígenos de melanoma asociados con membrana MM200 no caracterizados en las vesículas de membrana que forman la vacuna, los cuales permiten, por consiguiente, el suministro de una reserva compleja de antígenos a las células dendríticas (DCs), y de esta manera, no se limita la elección de los antígenos de vacuna a un antígeno de diferenciación de melanoma particular o de Cáncer/Testículos (CT). El análisis bidimensional con SDS-PAGE de la fracción de membrana a partir de las células de melanoma MM200 utilizadas en la Lipovaxina-MM ha revelado la presencia de >700 componentes de proteína separados.

La maduración de la célula dendrítica (DC) es esencial para superar la anergia de las células-T, un fenómeno reportado como asociado con el progreso del tumor [19, 20]. Para lograr esto, se ha incluido en la formulación el IFN-gamma, que modula múltiples funciones efectoras de las células dendríticas (DCs) [21]. Debido a que esta citoquina está físicamente asociada con la vacuna, las células dendríticas (DCs) reciben una señal estimulante apropiada al mismo tiempo en que llega a ellas la carga antigénica.

Las vesículas de membrana que son integrales de la Lipovaxina-MM llevan sobre su superficie numerosas copias de un dAb Vu recombinante marcado con His (DMS5000) que se seleccionó por su capacidad para dirigirse específicamente hacia el marcador superficial de las células dendríticas (DCs) humanas DC-SIGN (no integrina de sujeción de la molécula de adhesión intercelular 3

específica de la célula dendrítica (DC)), una lectina tipo-C. DC-SIGN es específicamente expresado por las células dendríticas (DCs) humanas [22]. Se induce durante la diferenciación de las células dendríticas (DCs), es moderadamente sub-regulado después de la maduración de las células dendríticas (DCs) [23], y está implicado en la captura y absorción de los patógenos en un rango de tamaños desde patógenos muy pequeños, tales como virus (VIH, virus de hepatitis C (HCV), Ébola, dengue), hasta las bacterias, hongos, y parásitos mucho más grandes [24]. DC-SIGN se internaliza rápidamente después del enlace del ligando [25], mostrando los estudios *in vitro* que los antígenos dirigidos hacia DC-SIGN sobre las células dendríticas (DCs) humanas son rápidamente endocitosados, transportados hasta los lisosomas, y presentados ante las células-T, tanto en un contexto de MHC Clase I como Clase II [26]. La estrategia de la Lipovaxina-MM utiliza un lípido quelante versátil que permite que una molécula marcada con His (tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) se asocie con la superficie de los liposomas o de las vesículas de membrana sin la necesidad de una modificación química adicional de la molécula injertada. *In vitro*, DMS5000 hace posible el suministro dirigido de los liposomas injertados con DMS5000 a las células que expresan el DC-SIGN humano, incluyendo las células dendríticas (DCs) derivadas de los monocitos. El suministro depende del DMS5000 y es específico para el DC-SIGN humano. Nuestros estudios de una Lipovaxina-MM fluorescentemente marcada, mediante el microscopio confocal, han

confirmado que, *in vitro*, el enlace de la vacuna a las células dendríticas (DCs) humanas es seguido por la internalización de la vacuna. Se espera que siga el procesamiento de los antígenos portados por la Lipovaxina-MM. Recientemente se ha reportado que la dirección *in vivo* de los antígenos hacia las células dendríticas (DCs) humanas a través de DC-SIGN, utilizando un modelo de ratón injertado (ratones trasplantados con células inmunes humanas), provoca las respuestas inmunitarias estimulantes e inhibe el crecimiento de los tumores injertados, apoyando, por consiguiente, la noción de que este receptor es un objetivo efectivo para el suministro de antígenos de cáncer [27].

Aunque en la presente se da una descripción específica de una vacuna de melanoma, se apreciará que la composición y los métodos de la invención se pueden adaptar para ser idóneos en el tratamiento de otros tumores, en especial tumores antigénicos, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, mama, pulmón, en particular carcinoma pulmonar microcelular (SCLC) o carcinoma pulmonar no microcelular (non-SCLC), hígado, seminomas, melanoma, y/o cánceres de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), cáncer de colon, cáncer de mama, glioblastoma, neuroblastoma, y cáncer medular de la tiroides.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos, para propósitos de ilustración solamente.

1) PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS, Y FORMULACIÓN

A) SUSTANCIA DE FÁRMACO - Antecedentes

La Lipovaxina-MM se prepara a partir de 6 ingredientes, los
5 cuales forman 4 "componentes de pre-formulación" de partida. La
composición y las características de los componentes de pre-
formulación de la Lipovaxina-MM se estipulan en la Tabla 1.

VESÍCULAS DE MEMBRANA

Los numerosos antígenos de vacuna se derivan a partir de la
10 fricción de membrana de las células de melanoma MM200 lisadas. La
línea celular MM200 es una línea celular de melanoma que se aisló a
partir de un melanoma primario originalmente removido a partir de
una mujer de 43 años de edad. Se han descrito la tipificación de HLA
(A1,3; B7,35; DR2,4), el análisis cromosómico, y el análisis
15 cariotípico de la línea celular [28]. Se reporta que la línea celular
MM200 expresa los antígenos de diferenciación de melanoma de
tirosinasa, gp100 y MART-1, y los antígenos de cáncer de testículos
MAGE-A3, MAGE A-10, BAGE, GAGE, y XAGE, pero no MAGE-A1,
CT-7, NA17-1 o "NY-ESO-1 [29]. Se ha demostrado que los pacientes
20 diagnosticados con melanoma tienen una alta frecuencia de
anticuerpos específicos de MM200 en su suero [30]. Los estudios
clínicos no relacionados también han reportado el uso de esta línea
celular para los estudios de vacunas de melanoma maligno [29, 31,
32].

25 Esta línea celular ha sido utilizada por otros en estudios

clínicos previos de una vacuna de melanoma MM200 de lisado de vacuna, y más de 400 pacientes han recibido una vacuna de lisado de vacuna basado en MM200 sin efectos adversos aparentes [29, 31, 32]. Las células MM200 utilizadas en los estudios clínicos previos de la Lipovaxina-MM se originan a partir de la misma reserva de células utilizadas en esos estudios, una sola ampollita (fecha el 28/01/1994) obtenida en el laboratorio del Profesor Peter Hersey (University of Newcastle, Oncology and Immunology Unit, Newcastle, Australia). La documentación recibida indica que las células "28/01/1994" se cosecharon a partir de un cultivo secundario de un cultivo primario de 1986, y que estas células han sido probadas y se ha confirmado que están limpias de agentes adventicios contaminantes. También se condujo la prueba de agentes adventicios sobre las células utilizadas en los estudios clínicos previos de la Lipovaxina-MM.

Se produce un solo lote de MVs MM200 a partir de una preparación de células MM200 a granel, para la producción del producto de investigación. La producción de las vesículas de membrana (MVs) se basa en la lisis de las células MM200 mediante sonicación, seguida por dos rondas de centrifugación, baja velocidad seguida por alta velocidad. La sonicación y la centrifugación para la producción de las vesículas de membrana (MVs) se conducen en múltiples lotes de procesamiento de 1 mililitro. Una sonicación breve ayuda en la formación de vesículas multilamelares que varían en tamaño, y forman el componente de antígeno de la vacuna. Las

vesículas portan numerosas proteínas, incluyendo los antígenos de melanoma.

Entonces se preparan las vesículas de membrana (MVs) volviendo a suspender los gránulos de membrana en suero regulado con fosfato (PBS). Las fracciones de membrana resultantes subsiguientemente se reservan para generar el material de vesículas de membrana (MVs) a granel. Todo el proceso se conduce asépticamente para prevenir la contaminación del material de vesículas de membrana (MVs). No es posible la esterilización terminal. Las vesículas de membrana (MVs) a granel subsiguientemente se dosifican asépticamente, de tal manera que cada frasco contenga suficiente material para la producción de 2 mililitros de Lipovaxina-MM. Se prueban alícuotas aleatorias para determinar la presencia de agentes adventicios y para determinar su perfil de antígeno de melanoma.

3NTA-DTDA

El sistema de N-ácido nitrilo-triacético (NTA)/marca His se utiliza ampliamente para el aislamiento de un paso y la purificación de las proteínas recombinantes. El ligando tetra-dentado NTA forma un complejo hexagonal con iones de metales divalentes, tales como Ni^{2+} , que ocupan cuatro de los seis sitios de enlace en el complejo. Los anillos de imidazol a partir de dos histidinas de un cordón de residuos de histidina consecutivos (también conocido como una marca-His) se enlazan a los sitios no acoplados del complejo de ion de metal-NTA. El enlace es sinérgico, y la proporción de 2:1

(histidina : ion de metal-NTA) crea una inmovilización estable de la molécula marcada con His.

El 3NTA-DTDA, como se describe en las Publicaciones Internacionales Números WO 00/64471 y WO 2005/018610, se sintetiza a través de una síntesis de seis pasos mediante el acoplamiento de cada grupo COOH del grupo cabezal NTA con otro grupo NTA. La fracción 3NTA resultante logra una densidad local más alta de grupos cabezales NTA que permite anclar de una forma más estable las proteínas marcadas con His. Entonces el grupo cabezal 3NTA se enlaza a dos cadenas de hidrocarburo de 14 átomos de carbono, para producir un lípido quelante que contiene un grupo cabezal 3NTA covalentemente enlazado a DTDA (ditetradecil-amina). Los iones de níquel ocupan cuatro de los seis sitios de enlace en cada uno de los grupos NTA. Las dos cadenas de hidrocarburo de 14 átomos de carbono forman una fracción de lípido que se puede insertar en la bicapa de lípido de los liposomas [33].

POPC

POPC (α -Palmitoil- β -Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina) es un fosfolípido con 2 cadenas de hidrocarburo asimétricas: una cadena de 16 átomos de carbono completamente saturada, y una cadena de 18 átomos de carbono mono-cis-insaturada con un doble enlace entre el 9° y el 10° átomos de carbono (18:1, 9). La temperatura de transición para POPC desde la fase de gel hasta la fase cristalina líquida es de alrededor de -4°C. POPC, el cual es un constituyente lípido normal de las membranas celulares, se utiliza ampliamente en

la preparación de liposomas. Esperion Therapeutics, Inc (Ann Arbor, MA) reportó un perfil de seguridad satisfactorio para la administración repetida de 14 a 16 miligramos de liposomas que contienen POPC cada 4 días por 7 ciclos (http://www.pharmaquality.com/mag/08092005/pfq_08092005_FO2.html).

Se producen liposomas sintéticos consistentes en una mezcla de POPC con cualquiera de NTA-DTDA [34-36], ó 3NTA-DTDA [37, 38], y se fusionan con las vesículas de membrana. Esto permite efectivamente la incorporación de cualquiera de los quelantes de lípido en la bicapa de lípido de las vesículas de membrana. Se injerta una proteína marcada con His (tal como DMS5000) sobre la superficie de las vesículas de membrana modificadas resultantes, recubriendo efectivamente, por consiguiente, la vesícula con un ligando, el cual permite que la vesícula se dirija específicamente hacia un receptor de superficie celular seleccionado. Las vesículas de membrana modificadas para contener cualquiera de NTA-DTDA ó 3NTA- DTDA se han utilizado para dirigirse a las células dendríticas (DCs) *in vivo* en los modelos de ratón [37].

SULFATO DE NÍQUEL

La Lipovaxina-MM en su formulación final contiene aproximadamente 10 microgramos/mililitro de sulfato de níquel (proporción molar de 1:1 del sulfato de níquel a los grupos cabezales NTA), todas las cuales se espera que se asocien con el lípido quelante 3NTA-DTDA. El níquel se enlaza a NTA con una alta afinidad ($K_d < 10^{-11} \text{M}$). Debido a que está presente en la misma

proporción molar que la fracción de NTA sobre el grupo cabezal de 3NTA-DTDA, se espera que la concentración de níquel libre en las preparaciones de Lipovaxina-MM sea extremadamente baja.

Aunque se ha reportado que el níquel y sus sales son tóxicos y carcinogénicos en altos niveles [39], el contenido de níquel dentro de la Lipovaxina-MM está bien dentro de los niveles aceptables. La población general toma la mayor parte del níquel a través del alimento, siendo la ingesta de níquel dietético occidental diaria promedio de 69 a 162 microgramos. Por consiguiente, inclusive la dosis más alta de 10 mililitros de Lipovaxina-MM, que contiene 100 microgramos de níquel, representa no más de la ingesta dietética diaria de níquel [40]. La excreción del níquel sistémicamente absorbido es principalmente a través de la orina; los valores de vida media son de alrededor de 28 horas, y dentro de 4 días se recupera el 100 por ciento de una dosis sistémica ya sea en la orina o bien como níquel no absorbido en las heces [39]. Se puede sacar un paralelo interesante con los pacientes con enfermedad renal crónica mantenidos con un régimen de diálisis, quienes pueden absorber hasta 100 microgramos de níquel por diálisis [41]. Se espera que el producto de investigación, en su dosis propuesta más alta, suministre cantidades de níquel que sean comparables con ese tipo de terapia.

Para preparar los liposomas, se prepara una mezcla de los dos lípidos en suero regulado con fosfato y complementados con níquel, y la preparación resultante se liofiliza. Los liposomas se almacenan

como un polvo liofilizado, el cual se reconstituye en agua durante el proceso de formulación.

DMS5000

DMS5000 es un anticuerpo de dominio (dAb) que tiene la
5 secuencia de aminoácidos estipulada en la Figura 12 (SEQ ID NO: 1;
SEQ ID NO: 3), y es altamente específico para el receptor de
superficie celular de células dendríticas (DC) humanas DC-SIGN (no
integrina de sujeción de molécula de adhesión intercelular-3
específica de células dendríticas (DCs)). Los anticuerpos de dominio
10 son las unidades de enlace funcional más pequeñas de los
anticuerpos, y consisten en la región variable de cualquiera de las
cadenas pesada (V_H) o ligera (V_L) de los anticuerpos humanos.
DMS5000 es un dAb V_H de 14,386 kDa, seleccionado con base en su
capacidad para facilitar el enlace de los liposomas que contienen
15 3NTA-DTDA a las células que expresan el DC-SIGN humano cuando
se injerta en los liposomas. La secuencia del dAb estipulada en la
SEQ ID NO: 1 es precedida por los residuos Ser-Thr que están
presentes en el polienlazador del vector de expresión, para
acomodar un sitio de clonación *Sa*I para la expresión. La secuencia
20 del dAb sin los residuos ST se estipula en la SEQ ID NO: 3.

DMS5000 se produce como una proteína secretada utilizando
un proceso que involucra la producción de la proteína en *E. coli*,
seguida por la captura de la proteína a partir del medio
acondicionado utilizando la Proteína A Streamline.

25 Otros contaminantes se remueven mediante cromatografía de

intercambio de aniones, y la endotoxina restante se remueve mediante su paso sobre un filtro Mustang E. La diálisis en la formulación final es seguida por filtración para esterilización. La proteína a granel resultante se somete finalmente al llenado y
5 acabado aséptico para producir el material en frasco para el estudio clínico.

Una mezcla de DMS5000-liposomas fluorescentes se puede enlazar a las células que expresan DC-SIGN — las células dendríticas (DCs) o cualquier otro tipo de células que se han
10 modificado genéticamente para expresar el DC-SIGN humano exógeno (por ejemplo, las células THP-1/DC-SIGN) — solamente cuando se agrega el lípido quelante 3NTA-DTDA a la mezcla de liposomas (Figura 2), confirmando, por consiguiente, que la asociación del DMS5000 con los liposomas depende del Ni-3NTA-
15 DTDA.

El microscopio confocal ha hecho posible la visualización de la interacción entre la Lipovaxina-MM y las células que expresan DC-SIGN — incluyendo las células dendríticas (DCs) humanas — confirmando, por consiguiente, que no solamente se enlaza a las
20 células objetivo sino que también es internalizado por las células dendríticas (DCs). Esto confirma que el suministro de Lipovaxina-MM al receptor de DC-SIGN sobre la superficie de las células dendríticas (DCs) humanas es seguido por endocitosis e internalización de la carga (Figura 3).

25 **B) ELABORACIÓN**

Cada uno de los ingredientes se elaboran de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), y cuando es posible, los componentes de pre-formulación se preparan de acuerdo con las Buenas Prácticas de Elaboración (GMP), en instalaciones
5 apropiadamente acreditadas.

El producto de investigación se formula mediante la combinación de las vesículas de membrana con el constituyente liposomal e IFN-gamma, y se fusionan mediante sonicación. Se agrega el DMS5000 en un paso final antes de administrar el producto
10 de investigación al paciente.

C) PROPIEDADES

i) FARMACOLOGÍA

En la dosis más alta, el paciente recibe un total de 7.449 miligramos de POPC, 0.297 miligramos de 3NTA-DTDA, 0.103
15 miligramos de sulfato de níquel, y 3.8 miligramos de DMS5000. En estas cantidades, se espera que sean de poca consecuencia farmacológica.

ii) ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN

La caracterización de la Lipovaxina-MM involucra el análisis de
20 cuando menos cuatro parámetros, todos los cuales se espera que afecten directamente a la potencia de la vacuna. Primeramente, se determina el injerto del DMS5000 mediante el enlace de su marca-His al Ni-3NTA-DTDA (Figura 4).

En segundo lugar, se confirma la capacidad de la vacuna para
25 dirigirse y enlazarse a las células que expresan DC-SIGN *in vitro*

(Figura 5).

En tercer lugar, se analiza la preparación de la vacuna para confirmar la asociación física de la citoquina IFN-gamma con la vacuna. Debido a que el modo de acción de la Lipovaxina-MM depende mucho del suministro de IFN-gamma a las células objetivo, la asociación de la citoquina con la vacuna es importante para su actividad (Figura 6).

Finalmente, la presencia de los antígenos asociados con melanoma en la preparación de la vacuna se confirma mediante análisis Western blot (Figura 7).

iii) ESTABILIDAD

Los siguientes tres criterios se utilizan para medir la estabilidad de la Lipovaxina-MM, incluyendo su estabilidad después del almacenamiento: (i) la capacidad de una preparación de vacuna para enlazarse a las células que expresan el DC-SIGN humano, (ii) la proporción de IFN-gamma que permanece físicamente asociado con las vesículas, y (iii) la actividad biológica del IFN-gamma enlazado con la vacuna. Debido a que la Lipovaxina-MM es una vacuna liposomal, las bicapas de membrana que forman la vacuna son susceptibles a daños por congelación en ausencia de un crioprotector apropiado. El almacenamiento del producto de investigación, por consiguiente, solamente es posible a temperaturas a las cuales no se congela. Un enlace de Lipovaxina-MM a 4°C a las células que expresan DC-SIGN permanece sin alteraciones durante un período de hasta 4 semanas (Figura 8).

La actividad de IFN-gamma total es estable durante hasta 4 semanas, pero parece disociarse progresivamente de la vacuna, con un tiempo de almacenamiento creciente a 4°C (Figura 9).

D) PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN

5 i) FORMULACIÓN

Cada dosis de Lipovaxina-MM es formulada por el farmacéutico del hospital no más de 5 horas antes de administrarse al paciente. El producto de investigación se formula a partir de 4 componentes de pre-mezcla: vesículas de membrana MM200, liposomas de POPC/Ni-
 10 3NTA-DTDA liofilizados, IFN-gamma y DMS5000. Para las dosis de 0.1 mililitros y de 1 mililitro, se preparan 2 mililitros del producto de investigación; para la dosis de 10 mililitros, se preparan 6 x 2 mililitros del producto de investigación, y se reservan antes de administrarse al paciente.

15 El DMS5000, que tiene la secuencia estipulada en la SEQ ID NO: 1, se produce como una proteína secretada en *E. coli* BL21(DE3) que contiene el vector pET30-GAS-DMS5000. pET30-GAS-DM5000 es un derivado de pET30 (Invitrogen), el cual incorpora el péptido de señal líder GAS universal (descrito, por ejemplo, en la Publicación
 20 Internacional Número WO 2005/093074) en el extremo N-terminal del DM5000. La proteína se purifica a partir del sobrenadante del cultivo del lote de fermentación, mediante una serie de pasos de cromatografía, incluyendo PrA Streamline (para capturar las moléculas de dAb correctamente plegadas), SP Sepharose
 25 (purificación de intercambio de cationes), y Mustang E (para remover

los contaminantes de endotoxina). Se mostró que la pureza fue del >95 por ciento mediante Enfoque Isoeléctrico, >95 por ciento mediante Cromatografía por Exclusión de Tamaños, y >80 por ciento mediante Cromatografía de Líquidos a Alta Presión en Fase Inversa. Los niveles de endotoxina fueron de <50 EU/ml. La proteína resultante se formula en suero regulado con fosfato (1 miligramo/mililitro) para utilizarse en la producción de Lipovaxina-MM.

El llenado y acabado aséptico del material a granel se conduce en una instalación apropiada para producir lotes de 1 mililitro en frascos de vidrio.

Se producen 13 gramos de 3NTA-DTDA de acuerdo con el protocolo de síntesis publicado (45), y se muestra que es de una pureza del >89 por ciento.

POPC de grado GMP se adquirió en Avanti Polar Lipids (Número de Catálogo 770557, Lote # GN160181PC-23).

NiSO₄ de grado Puratronic® (99.9985 por ciento) se adquirió en Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH & Co. KG (Zeppelinstrasse 7 - D-76185 Karlsruhe, Alemania); Número de Inventario 10820, Número de Lote 22818; CAS# 15244-37-8. El material se esterilizó mediante filtración y se dosificó mediante llenado y acabado aséptico a 0.6 miligramos/litro en agua estéril a 2 mililitros por frasco (1.2 miligramos de Sulfato de NiSO₄ por frasco) en la Compañía RadPharm Scientific ubicada en Canberra.

Los liposomas liofilizados se preparan como sigue: el 3NTA-DTDA se formula en suero regulado con fosfato y POPC en etanol.

Cada solución se esteriliza mediante filtración, y entonces se mezcla. Se agrega el NiSO_4 estéril a la mezcla, la cual se dosifica asépticamente en frascos individuales una vez que se completa la mezcla, en cantidades suficientes para producir 2 mililitros del producto de investigación. El material finalmente se seca por congelación, y se prueba para determinar su esterilidad, pureza, y actividad. La estabilidad del material almacenado se prueba a intervalos regulares hasta que el último paciente haya terminado su programa de vacunación.

El antígeno a granel se prepara como sigue: La producción implica la propagación de las células MM200 en el medio AIM-V sin suero (Número de Catálogo 0870112DK), la cosecha de esas células en suero regulado con fosfato, y finalmente, la producción de las vesículas de membrana también en suero regulado con fosfato. Antes de la producción de las vesículas, las células cosechadas se prueban para determinar los agentes adventicios y la pureza. También se prueban alícuotas aleatorias de las preparaciones de vesículas de membrana para determinar la presencia de agentes adventicios y del antígeno de melanoma.

ii) **FORMA DE DOSIFICACIÓN FINAL Y PRESENTACIÓN**

El producto de investigación se formula en suero regulado con fosfato. Cuando se administran 10 mililitros del producto de investigación, se preparan 6 (seis) lotes de Lipovaxina-MM, y los lotes se combinan en un solo frasco en seguida de la formulación, antes de que se administre el producto de investigación al paciente.

El farmacéutico del hospital lleva a cabo la formulación y la reserva del lote en un gabinete de flujo laminar Clase II, empleando la técnica aséptica.

El producto de investigación es de una apariencia nebulosa, y tiene tendencia a asentarse cuando se deja sin alterarse (la apariencia granular del producto de investigación se correlaciona con el injerto exitoso del DMS5000 sobre la superficie de las vesículas).

iii) ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Los componentes de pre-formulación de Lipovaxina-MM se deben almacenar a -20°C, con la excepción del IFN-gamma (Imukin, Boehringer Ingelheim, Alemania), el cual se debe almacenar a 4°C como es recomendado por el fabricante. Una vez formulado en la farmacia del hospital, el producto de investigación se almacena a 4°C durante no más de 6 horas.

El producto de investigación se debe mezclar mediante la inversión repetida del frasco pero no debe ponerse en vórtex antes de su administración a los sujetos.

iv) ADMINISTRACIÓN

La composición se administra mediante administración intravenosa lenta directa.

2) ESTUDIOS IN VITRO: EFECTO DE LA LIPOVAXINA-MM SOBRE LOS MARCADORES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC)

Las células dendríticas derivadas de monocitos generadas *in vitro* se pueden utilizar para probar el efecto específico de la Lipovaxina-MM sobre la maduración de la célula dendrítica (DC).

Para lograr esto, las células progenitoras de monocitos se preparan a partir de células mononucleares de sangre periférica que se cultivan *in vitro* en la presencia de una mezcla de IL-4 y GM-CSF durante 5 a 6 días, al final de cuyo período esas células expresan el DC-SIGN marcador. Cuando se co-cultiva la Lipovaxina-MM con las células dendríticas humanas derivadas de monocitos (DCs) *in vitro*, se sobre-regulan un número de marcadores de maduración de la célula dendrítica (DC), incluyendo CD64, CD40, CD86, CD80 y HLA-ABC, y hasta un menor grado, HLA-DR, y se detecta la citoquina IL-12 en el medio acondicionado. La sobre-regulación de los marcadores se presenta solamente cuando la vacuna lleva IFN-gamma, confirmando que el suministro *in vitro* del antígeno solo puede estimular la maduración adecuada, y es la más alta cuando se suministra específicamente a las células dendríticas (DCs) por medio de la dirección del DC-SIGN.

La evidencia a partir de los estudios no clínicos sugiere que la Lipovaxina-MM *in vitro* es capaz de dirigir específicamente el marcador de célula dendrítica (DC) humano DC-SIGN para el suministro de su carga antigénica a las células dendríticas (DCs), muy probablemente por medio de la senda endocítica desencadenada por este receptor. La dirección de la Lipovaxina-MM hacia el DC-SIGN también es acompañada por un aumento específico en la maduración de los marcadores de superficie celular de la célula dendrítica (DC), así como en la producción de IL-12, una citoquina importante en la diferenciación de las células-T puras en

células Th1.

3) ESTUDIOS NO CLÍNICOS

In vivo, los estudios se han limitado a las especies de animales que se sabe que expresan homólogos de DC-SIGN con patrones consistentes con aquéllos que se ven en los seres humanos. Se han
5 utilizado dos especies, el tití común y el macaco, pero se encontró eventualmente que solamente el macaco es relevante para los estudios de inmunogenicidad. En los macacos, se demostró que la Lipovaxina-MM induce las respuestas inmunitarias mediadas por
10 células y humorales en las dos dosis probadas, a pesar del hecho de que *in vitro*, se demostró que su capacidad enlazarse/dirigirse al DC-SIGN de macaco es significativamente más baja que su capacidad para enlazarse/dirigirse al DC-SIGN humano. Inclusive en la dosis más alta, no se vieron efectos adversos significativos, con la
15 excepción de un aumento transitorio en los niveles de AST, y un aumento transitorio en los niveles de ALT que se ven solamente siete días después de la segunda dosis en dos animales diferentes. Los niveles de colesterol, triglicéridos, y LDL fueron consistentemente más bajos al final del estudio en los cuatro animales, comparándose
20 con los niveles antes de la vacunación, mientras que los niveles de HDL fueron consistentemente más altos después de las cuatro series de vacunación en los cuatro animales.

i) ESTUDIOS DE PRUEBA DEL CONCEPTO EN UN MODELO DE RATÓN - COMPENDIO:

25 Se condujo un estudio de prueba del concepto para la

plataforma de Lipovaxina en los ratones. Debido a que DC-SIGN no es expresado por las células dendríticas de ratón, este estudio investigó la dirección de una vacuna hacia el receptor DEC-205, una lectina tipo-C expresada por las células dendríticas (DCs) de ratón.

5 El estudio mostró que una preparación cruda de las vesículas de membrana a partir del melanoma de murino altamente metastásico (B16-OVA) se puede dirigir hacia las células dendríticas (DCs) *in vivo* para provocar efectos funcionales. Cuando se utilizan en ratones singénicos, la vacuna B16-OVA estimuló fuertes respuestas

10 de CTL en las células-T esplénicas, e indujo una notoria protección contra el crecimiento tumoral. La protección fue dependiente del suministro simultáneo tanto del antígeno como de la maduración de la señal de la célula dendrítica (DC). La administración de la vacuna de B16-OVA-DC dirigida a los ratones estimulados con células B16-

15 OVA indujo un dramático efecto inmunoterapéutico, y prolongó la sobrevivencia sin la enfermedad.

EN DETALLE: Se condujo un estudio con animales par aprobar la tecnología de la plataforma de Lipovaxina en el modelo de cáncer de melanoma B16-OVA de murino [37]. La formulación de la vacuna

20 utilizada en este estudio difiere de la Lipovaxina-MM, y es específica para este modelo animal. El modelo de cáncer de melanoma B16-OVA de murino es un tumor altamente metastásico que, cuando se inocula intravenosamente en ratones, causa cáncer y la muerte en los animales, a través de su capacidad para metastatizarse,

25 inicialmente hacia los pulmones, y subsiguientemente hacia otros

órganos. La plataforma de Lipovaxina se utilizó para construir una vacuna preparada ya sea a partir de células B 16-OVA cultivadas, o bien en la forma de liposomas modificados para incorporar el péptido OVA o SIINFEKL. En todos los casos, la dirección hacia las células dendríticas (DCs) se aseguró utilizando ScFv específico para el marcador DEC-205, y se incluyó la citoquina inmunomoduladora de interferón-gamma como la "señal de peligro". Se inocularon grupos de seis ratones C57B1/6 con 1.5×10^5 células de melanoma B16-OVA, y entonces se administró ya sea el suero regulado con fosfato o bien se administró la vacuna (la cual comprende 2×10^5 equivalentes celulares de vesículas de membrana (MV) derivadas de B16-OVA injertadas con ScFv) intravenosamente a los ratones en los días 3, 6 y 9 después de la inoculación del tumor. Los animales de control desarrollaron una carga tumoral masiva con un promedio de 250 ± 37 focos tumorales en los pulmones para el día 16 (los animales se sacrificaron en el día 22). En un fuerte contraste, los ratones vacunados no mostraron signos de desarrollo tumoral hasta 8 meses después de la agresión tumoral. Las vesículas de membrana (MVs) modificadas también indujeron una inmunidad protectora contra los tumores en este sistema. Los ratones inmunizados con la vacuna (la cual comprende 2×10^5 equivalentes celulares de vesículas de membrana (MVs) derivadas de B16-OVA injertadas con ScFv) se examinaron para determinar su capacidad para resistir una agresión intravenosa con células B16-OVA. Cuando se cuantificaron las metástasis pulmonares 16 días después de la agresión tumoral, los

ratones vacunados mostraron un número mucho más bajo de metástasis, comparándose con los ratones de control, pero solamente cuando se incorporó un IFN-gamma o LPS de "señal de peligro" en la vacuna. El estudio demostró con éxito que los

5 esplenocitos aislados a partir de ratones vacunados con las vesículas de membrana (MVs) modificadas, mostraron la máxima actividad de CTL cuando las vesículas de membrana (MVs) se dirigieron hacia las células dendríticas (DCs) (ya sea por medio de DEC205 o bien de CDI Ic), e incluyeron una señal de peligro

10 relevante (IFN-gamma o LPS). El estudio, por consiguiente, confirma que la vacuna producida utilizando la tecnología de Lipovaxina es efectiva para inhibir el crecimiento tumoral de B16-OVA y la metástasis en este modelo animal, y que este planteamiento puede simplificar mucho las estrategias actuales empleadas para la

15 producción de la vacuna de cáncer basada en células dendríticas (DCs) y la inmunoterapia en los seres humanos.

ii) ESTUDIO DE LIPOVAXINA-MM EN TITÍ

COMPENDIO: Se condujo un estudio inicial de Lipovaxina-MM en el tití común (*Callithrix jacchus*), el primate no humano más

20 pequeño utilizado en la investigación biomédica. En el tití, la expresión de DC-SIGN se detecta en el bazo y en el ganglio linfático mediante inmunohistoquímica (utilizando un anticuerpo monoclonal (mAb) humano anti-DC-SIGN). Cuando se inició el estudio con el tití, se esperaba cierto grado de reactividad cruzada entre DMS5000 y

25 DC-SIGN de tití pero no se pudo confirmar. Los animales recibieron 5

dosis de 0.06 mililitros de la vacuna a intervalos semanales (una dosis que es equivalente a una dosis humana de 10 mililitros escalada basándose en el peso en el tití). El tratamiento fue bien tolerado pero no se observó una evidencia significativa de inmunogenicidad. Subsiguientemente se encontró que la "señal de peligro", IFN-gamma (humano), incluida en la formulación, tiene una actividad biológica reducida *in vitro* cuando se utiliza para estimular los monocitos sanguíneos periféricos del tití. Esto se identificó como una posible causa para la falta aparente de inmunogenicidad de Lipovaxina-MM en estos animales. Desde la terminación de este estudio, la clonación del gen de DC-SIGN de tití ha facilitado los estudios de enlace más extensos utilizando células que se han modificado para expresar DC-SIGN de tití. Estos estudios indican ahora que el enlace de Lipovaxina-MM al DC-SIGN de tití es mínimo, cuando menos *in vitro*. La afinidad reducida aparente de la Lipovaxina-MM por el DC-SIGN de tití, en combinación con la actividad reducida de IFN-gamma en estos animales, habría deteriorado de una manera significativa la capacidad de la Lipovaxina-MM para inducir una respuesta inmunitaria detectable en estos animales.

EN DETALLE: El tití común (*Callithrix jacchus*) es el primate no humano más pequeño utilizado en la investigación biomédica. En el tití, la expresión de DC-SIGN se detecta en el bazo y en el ganglio linfático mediante inmunohistoquímica (utilizando un anticuerpo monoclonal (mAb) humano anti-DC-SIGN). Cuando se inició el

estudio con el tití, se esperaba cierto grado de reactividad cruzada entre DMS5000 y DC-SIGN de tití. Dos grupos de animales (3 animales en cada grupo) recibieron 5 dosis de 0.06 mililitros de la vacuna a intervalos semanales. Los dos grupos diferían en el dAb
5 utilizado para insertarse sobre la superficie de la vacuna — un grupo recibió la vacuna injertada con DMS5000, y el segundo grupo se injertó con un 'dAb simulado' (un dAb sin un objetivo específico). No hubo efectos adversos serios asociados con la administración repetida de cualquiera de las dos vacunas en una dosis equivalente
10 a una dosis humana de 10 mililitros (escalada basándose en el peso en el tití). Los pesos de los animales fueron relativamente estables. No se observaron cambios significativos en los parámetros hematológicos. El análisis del subconjunto de leucocitos identificó un aumento en las células dendríticas (DCs) mieloides circulantes en
15 los seis animales. Los animales que habían recibido la vacuna dirigida mostraron una disminución en las células dendríticas (DCs) plasmacitoideas circulantes. Se reportó una irritación después de la dosis 1 , que fue más pronunciada en el abdomen de los animales que habían recibido la Lipovaxina-MM no dirigida. La irritación
20 recurrió en los animales del grupo de la vacuna no dirigida después de la dosis 5 solamente. Ninguno de los animales pareció estar incómodo. No se observó una evidencia significativa de inmunogenicidad. Subsiguientemente se encontró que la "señal de peligro", IFN-gamma (humano), incluida en la formulación, tiene una
25 actividad biológica reducida *in vitro* cuando se utiliza para estimular

los monocitos sanguíneos periféricos del titi. Esto se identificó como una posible causa para la falta aparente de inmunogenicidad. Desde la terminación de este estudio, la clonación del gen de DC-SIGN de titi ha facilitado los estudios de enlace más extensos utilizando
5 células que se han modificado para expresar DC-SIGN de titi. Estos estudios indican ahora que el enlace de la Lipovaxina-MM al DC-SIGN de titi es mínimo, cuando menos *in vitro*.

iii) INMUNOGENICIDAD DE LIPOVAXINA-MM EN MACACOS DE COLA DE CERDO

10 COMPENDIO: Se condujo una prueba final de Lipovaxina-MM en el primate no humano *Macaca nemestrina* (macaco de cola de cerdo). Se seleccionó esta especie animal debido a que el receptor de DC-SIGN de macaco está altamente conservado al nivel de los aminoácidos, comparándose con su contraparte humana, y realiza
15 una función análoga a la de un receptor endocítico. La distribución en el tejido de las células que expresan DC-SIGN en el macaco también corresponde en términos generales con aquélla que se ve en los tejidos humanos con solamente algunas diferencias menores. En el estudio se probaron dos grupos de animales, que difirieron en la
20 dosis de la vacuna administrada a los animales. A cuatro animales se les administraron tres dosis de 0.6 mililitros de la Lipovaxina-MM (la cual es equivalente a una dosis humana de 10 mililitros escalada hacia abajo basándose en el peso corporal), y a cuatro animales se les administraron dosis de 5 mililitros de la Lipovaxina-MM (50 por
25 ciento de la dosis humana más alta propuesta, no ajustada para el

peso del animal) a intervalos de 4 semanas. La vacuna se administró intravenosamente bajo sedación en la vena safenosa. Aunque los estudios de enlace *in vitro* de Lipovaxina-MM para DC-SIGN de macaco habían establecido que el dAb se enlaza con una afinidad mucho más baja al receptor de DC-SIGN de macaco de lo que lo hace a su contraparte humana, el estudio confirmó que la vacuna era capaz de inducir niveles detectables de los anticuerpos específicos de la vacuna, que fueron muy evidentes en los animales del grupo de dosis más alta, y una respuesta mediada por células (detectada basándose en la producción de citoquinas por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) recolectadas después de la vacunación) que fue muy evidente en los animales del grupo de dosis más baja.

EN DETALLE: Se condujo un estudio de Lipovaxina-MM en el macaco de cola de cerdo (*Macaca nemestrina*). Se confirmó que el IFN-gamma humano era biológicamente activo a través de los ensayos de estimulación *in vitro* de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) del macaco de cola de cerdo. Por consiguiente, no hubo dudas acerca de la actividad biológica de la señal de peligro de la vacuna. Las secuencias de aminoácidos de DC-SIGN de macaco son fácilmente accesibles, y se sabe que son aproximadamente el 93 por ciento idénticas a la secuencia de aminoácidos del DC-SIGN humano en la región de enlace de lectina — la misma región que se utilizó para generar el DMS5000. Debido a que se sabe que muchos de los anticuerpos monoclonales

reproducidos contra el DC-SIGN humano reaccionan cruzadamente con el DC-SIGN de macaco [42, 43], se había anticipado cierto grado de reactividad cruzada del DMS5000 con el DC-SIGN de macaco. Los estudios *in vitro* de la Lipovaxina-MM utilizando tanto las células dendríticas (DCs) de macaco derivadas de monocitos, como las células THP-1 que se habían modificado para expresar el DC-SIGN de macaco exógeno, identificaron, sin embargo, que el DMS5000 tenía una afinidad más baja por el DC-SIGN de macaco de cola de cerdo que por el DC-SIGN humano. El estudio de Lipovaxina-MM en 8 macacos de cola de cerdo se diseñó para proporcionar información de seguridad e inmunogenicidad para apoyar una aplicación para un estudio clínico en Fase I primeramente en humanos. Dado que se demostró que la Lipovaxina-MM se dirige al DC-SIGN de macaco con una afinidad más baja que al DC-SIGN humano, se entendió que el estudio podría subestimar la inmunogenicidad potencial de la vacuna en este modelo animal. Se probaron dos dosis (0.6 mililitros, y 5 mililitros) en el estudio. La dosis más baja es equivalente a una dosis humana de 10 mililitros escalada hacia abajo basándose en un peso humano promedio de 70 kilogramos, y en un peso del animal de 4 kilogramos. La dosis más alta es equivalente al 50 por ciento del volumen absoluto de la dosis humana más alta propuesta, la cual también fue el máximo volumen que se pudo administrar al animal bajo los lineamientos de la instalación de los animales. Esto es equivalente a aproximadamente 8 veces la dosis humana más alta si se escalara basándose en el peso corporal del macaco. Los macacos

se dividieron en dos grupos de cuatro animales. El primer grupo recibió 3 dosis de 0.6 mililitros de Lipovaxina-MM a intervalos de 4 semanas, y el segundo grupo recibió 3 dosis de 5 mililitros de Lipovaxina-MM. Los animales del segundo grupo también recibieron una dosis adicional de Lipovaxina-MM 7 días después de la dosis 3, como es recomendado por los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Los cuatro animales se sacrificaron 7 días después de esta cuarta dosis como parte de un estudio de seguridad. Ambas dosis de la Lipovaxina-MM dieron como resultado la producción de la citoquinas IFN-gamma, TNF-alfa e IL-6 por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) tan pronto como 7 días después de la primera dosis (Figura 9), pero solamente se detectaron anticuerpos específicos de Lipovaxina-MM en los animales que recibieron la dosis más alta de Lipovaxina-MM. Esto indica que, en los macacos, el tipo de respuesta inmunitaria inducida por la Lipovaxina-MM fue afectada por la dosis de la vacuna administrada, y que la dosis más baja de la vacuna pareció ser efectiva para estimular las respuestas inmunitarias mediadas por células (las cuales son críticas para una respuesta anti-tumoral), mientras que la dosis más alta fue capaz de inducir la inmunidad humoral. Por consiguiente, a pesar de afinidad más baja del DMS5000 por el DC-SIGN de macaco, la Lipovaxina-MM fue capaz de estimular una respuesta inmunitaria específica de la vacuna detectable en los animales vacunados.

a) **COMPENDIO**

En el estudio de macaco de cola de cerdo ilustrado anteriormente, a cuatro animales se les administraron 4 dosis de 5 mililitros de Lipovaxina-MM (50 por ciento de la dosis humana propuesta más alta real). La vacuna fue bien tolerada y segura cuando se administró en esa dosis. Las únicas lecturas anormales se observaron en el día 35, cuando se observó un aumento en los niveles de amino-transferasa en dos animales (dos enzimas diferentes e los dos diferentes animales). El aumento fue transitorio debido a que no se observó después de la dosis 3 ó 4 para esos dos animales, o para cualesquiera otros animales en el estudio. En la necropsia, se observó hiperplasia folicular multifocal en el bazo y en los ganglios linfáticos. Esta observación sugiere que la Lipovaxina-MM ha sido procesada por las células dendríticas (DCs). También se identificó hiperplasia del tejido linfoide en los pulmones, en el intestino, y en el hígado para todos los animales. Se ha reportado la expresión de DC-SIGN para las células dendríticas (DCs) en los tres órganos tanto en humanos como en macacos. Por consiguiente, a pesar de la afinidad más baja del DMS-5000 por DC-SIGN de macaco, la vacuna indujo con éxito una reacción en los órganos inmunes que se ha reportado que expresan DC-SIGN. La reactividad visiblemente incrementada de los órganos linfoides indica una respuesta inmunitaria activa.

b) HEMATOLOGÍA

En cada extracción de sangre, se condujo un panel de prueba de hematología de rutina, el cual incluyó recuentos de glóbulos blancos, recuentos de glóbulos rojos, y recuentos de plaquetas. También se evaluaron la hemoglobina, hematocrito, y los niveles de MCV y MCHC. Los resultados de la prueba se compararon con los valores "normales" publicados para los macacos.

Los recuentos de glóbulos blancos totales variaron para cada individuo en los diferentes puntos del tiempo, pero no mostraron una tendencia consistente. Los recuentos de glóbulos rojos sanguíneos totales permanecieron relativamente sin cambios durante el periodo del estudio. Todos los valores parecieron estar dentro del rango "normal". Se observó que, con la excepción de un animal, el porcentaje de linfocitos en la sangre periférica al final del estudio fue en términos generales más alto que al principio del estudio. Inversamente, los porcentajes de neutrófilos fueron en términos generales más bajos al final del estudio, comparándose con los valores iniciales.

c) BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Se monitoreó la función hepática de los animales en seguida de la administración de Lipovaxina-MM basándose en los niveles de amino-transferasa en sangre para la amino-transferasa de aspartato (AST o SGOT), y amino-transferasa de alanina (ALT o SGPT). Los niveles de ambas enzimas variaron de una manera significativa entre cada uno de los animales en los diferentes puntos del tiempo, pero

en términos generales estuvieron dentro de los niveles "normales" publicados, con la excepción de dos lecturas en el día 35 del estudio. En el día 35, se observó un alto nivel de AST en un animal, y se identificó un alto nivel de ALT en un segundo animal. Ambos valores estuvieron elevados más allá de los valores normales en el día 35 del estudio, pero no en el día 42 o en cualquier punto del tiempo subsiguiente; éstos se enlistan en la Tabla 2.

TABLA 1

Niveles de AST y ALT en hígado de macaco a través de todo el estudio de toxicología

Las dos lecturas anormales observadas en el día 35 del estudio están subrayadas. AST = amino-transferasa de aspartato, ALT= amino-transferasa de alanina, actividad enzimática medida en unidades por litro.

	Animal # 2.5407		Animal # 2.536		Animal # 8874		Animal # 6105	
	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT
Día 0	64	45	85	52	40	27	23	37
Día 7	66	44	65	46	29	26	21	33
Día 35	82	<u>150</u>	51	38	<u>166</u>	55	30	29

	Animal # 2.5407		Animal # 2.536		Animal # 8874		Animal # 6105	
	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST	ALT
Día 42	65	61	50	32	24	44	16	61
Día 63	72	67	39	33	24	29	20	32
Día 70	59	60	59	45	34	26	22	24

d) NECROPSIA

El examen histopatológico reveló una hiperplasia folicular multifocal de todo el tejido linfoide, lo cual es consistente con una respuesta inmunitaria celular. Se observó hiperplasia folicular multifocal en el bazo, pulmón e intestinos de todos los animales (Tabla 3).

Las muestras de hígado a partir de dos de los cuatro animales mostraron evidencia de infiltración leve de células mononucleares perivasculares multifocales. Los mismos dos animales habían devuelto resultados de AST y ALT altos en el día 35 del estudio.

TABLA 2
Compendio del examen histopatológico conducido como parte

del estudio de toxicología.

NSL: Lesión No Específica

		B1 (2.5407) Observa- ciones	B1 (2.5360) Observa- ciones	B1 (8874) Observa- ciones	B1 (6105) Observa- ciones
5	Cerebro	NSL	NSL	NSL	NSL
	Cerebelo	NSL	NSL	NSL	NSL
10	Higado	Infiltración leve de células mononu- cleares perivascu- lares multifocales	NSL	Infiltración leve de células mononu- cleares perivascu- lares multifocales	Degenera- ción hidrópica leve
15	Bazo	Hiperplasia folicular multifocal (pulpa blanca)	Hiperplasia folicular multifocal (pulpa blanca)	Hiperplasia folicular multifocal (pulpa blanca)	Hiperplasia folicular multifocal (pulpa blanca)
20	Pulmones	Hiperplasia leve de	Hiperplasia leve de	Hiperplasia leve de	Congestión vascular,
25					

		B1 (2.5407) Observa- ciones	B1 (2.5360) Observa- ciones	B1 (8874) Observa- ciones	B1 (6105) Observa- ciones
5		tejido linfoide multifocal	tejido linfoide multifocal	tejido linfoide multifocal	Hiperplasia leve de tejido linfoide multifocal
10	Riñón	NSL	NSL	NSL	NSL
	Corazón	NSL	NSL	NSL	NSL
	Páncreas	NSL	NSL	NSL	NSL
15	Testículos	NSL	- - -	NSL	- - -
	Ovario	- - -	NSL	- - -	NSL
	Útero	- - -	NSL	- - -	NSL
20	Ganglio linfático	Hiperplasia folicular multifocal	Hiperplasia folicular multifocal	Hiperplasia folicular multifocal	Hiperplasia folicular multifocal
25	Tráquea	NSL	Mineraliza- ción de cartilago hialino	NSL	NSL

		B1 (2.5407) Observa- ciones	B1 (2.5360) Observa- ciones	B1 (8874) Observa- ciones	B1 (6105) Observa- ciones
5	Músculo	NSL	NSL	NSL	NSL
	Suprarrenal	NSL	NSL	NSL	NSL
	Vejiga Urinaria	NSL	NSL	NSL	NSL
10	Estómago	NSL	NSL	NSL	NSL
15	Intestino	Hiperplasia leve de tejido linfoide multifocal	Hiperplasia leve de tejido linfoide multifocal	Hiperplasia leve de tejido linfoide multifocal	Hiperplasia leve de tejido linfoide multifocal
20	Biopsia de piel y vena de la extre- midad infe- rior: Derecha: Izquierda:	 NSL NSL	 NSL NSL	 NSL NSL	 NSL NSL

e) TOXICOLOGÍA

25 Este estudio se condujo como una extensión para el estudio de

eficacia de la Lipovaxina-MM descrito anteriormente. Los cuatro animales que habían recibido la dosis más alta (5 mililitros) recibieron una cuarta dosis, después de lo cual, los animales se sacrificaron para la necropsia. Los animales se monitorearon estrechamente en seguida de la administración de la vacuna, y se condujo el análisis de hematología y bioquímica sanguínea antes y después de cada vacunación. La vacuna fue bien tolerada cuando se administró en la dosis de 5 mililitros. El único efecto adverso significativo que podría estar relacionado con la vacuna fue un aumento en los niveles de amino-transferasa observados una semana después de la dosis 2, en dos animales diferentes (un animal tuvo un aumento de 3.4 veces en la amino-transferasa de alanina (ALT), comparándose con las lecturas obtenidas antes de la administración de la segunda dosis, mientras que el segundo animal tuvo un aumento de 5.7 veces en la amino-transferasa de aspartato (AST)). El aumento fue transitorio, y es posible que fuera un artificio. No se observó en una prueba adicional conducida 7 días después de la lectura anormal, no se observó en ningún momento después de la dosis 3 ó 4 para estos dos animales, o cualesquiera otros animales en el estudio. Durante el estudio, se encontró que los niveles de colesterol, triglicéridos y LDL fueron consistentemente más bajos al final del estudio en los cuatro animales, al compararse con los niveles que se vieron antes de que se iniciara el régimen de vacunación, mientras que los niveles de HDL fueron consistentemente más altos después de las cuatro series de

vacunación en los cuatro animales. El significado de esta observación no está claro. La hematología y otros parámetros de la bioquímica sanguínea no mostraron tendencias particulares.

En la necropsia, se observó hiperplasia folicular multifocal en el bazo y en los ganglios linfáticos; ambos órganos son ricos en las células que expresan DC-SIGN tanto en seres humanos como en macacos. El alto nivel de actividad que se ve en estos órganos del sistema inmunológico sugiere que la Lipovaxina-MM fue procesada con éxito por las células del sistema inmunológico, y que se generó una respuesta inmunitaria activa. También se identificó hiperplasia del tejido linfoide en los pulmones, intestino e hígado para todos los animales. También se ha reportado la expresión de DC-SIGN para las células dendríticas (DCs) en los tres órganos, tanto en seres humanos como en macacos. Este hallazgo refleja que, a pesar de la afinidad más baja del DMS-5000 por DC-SIGN de macaco, la vacuna parece haber estimulado con éxito una respuesta inmunitaria en esos órganos que tenían altos niveles de células dendríticas (DCs) que expresaban DC-SIGN, como se identifica por la reactividad visiblemente incrementada de todos los órganos linfoides.

4) JUSTIFICACIÓN DE LA DOSIS

Debido a que la Lipovaxina-MM es una vacuna/inmunoterapia derivada de células, la dosis de Lipovaxina-MM se puede describir basándose en el número de células que se utilizan para derivar la fracción "antigénica" del producto final. En nuestros estudios, se prepara 1 mililitro de Lipovaxina-MM utilizando el material de

fracción de membrana derivado a partir de 10^7 células de melanoma MM200, que se combinan con POPC (0.98 milimoles), 3NTA-DTDA (0.02 milimoles), NiSO_4 (0.06 milimoles), y DMS5000 (0.026 milimoles), con DMS5000 que se agrega en un exceso de
5 aproximadamente 1.3 veces, al 3NTA-DTDA para asegurar que estuvieran ocupados todos los grupos cabezales de 3NTA.

Un estudio pre-clínico de una vacuna basada de 3NTA-DTDA dirigida hacia el DEC-205 relacionado (DEC-205 es otra lectina tipo-C expresada por las células dendríticas (DC)) en los ratones [37]
10 utilizó una vacuna preparada a partir de 2×10^5 células por dosis. No se había buscado una dosis efectiva mínima para esta vacuna dirigida a las células dendríticas (DC) en el modelo de ratón. Si esta dosis antigénica se fuera a escalar, basándose en el peso, una dosis clínica requeriría del uso de material antigénico derivado a partir de
15 5.6×10^6 células. Este estudio primeramente en el hombre, investiga tres dosis de la Lipovaxina-MM a través de un estudio de escala de dosis de diseño adaptable. La dosis inicial para utilizarse en el estudio es guiada por el estudio de toxicidad del macaco. Si se escalara basándose en el peso humano promedio de 70 kilogramos y
20 en el peso de macaco promedio de 4 kilogramos, 1 mililitro de Lipovaxina-MM en los seres humanos se iguala con 0.06 mililitros en los macacos. La dosis inicial de 0.1 mililitros, por consiguiente, es una sexta parte del volumen absoluto de la dosis más baja dada a los macacos, o si se ajusta basándose en el peso, sería equivalente
25 a 0.006 mililitros para el macaco, y esto está bien por debajo de la

dosis más baja administrada a estos animales. La dosis más alta planeada de 10 mililitros es 2 veces el volumen más alto absoluto dado a los macacos. Se observa que los macacos tuvieron una elevación de transaminasa transitoria, con cambios histopatológicos de la infiltración de monocitos en el hígado en una dosis de 5 mililitros que iguala la dosis de 87.5 mililitros en los seres humanos (si se ajusta basándose en el peso humano promedio de 70 kilogramos, y en el peso del macaco promedio de 4 kilogramos). Se planea una escala de 10 veces entre cohortes, y esto es consistente con la escala de dosis en los estudios de la vacuna. Sin embargo, si las señales de inmunogenicidad y/o seguridad (por ejemplo, respuesta inmunitaria robusta con una elevación transitoria de la transaminasa de grado 2) sugieren un problema con la escala de 10 veces, se selecciona una dosis intermedia.

En comparación, se han conducido estudios en Fase II no relacionados que utilizaron una vacuna de melanoma basada en MM200 que se formuló a partir de los lisados celulares MM200 infectados con el virus de vacuna, preparados a partir de 5×10^6 células MM200, y se demostró que esa dosis era inmunogénica [31, 32]. Por consiguiente, para este estudio, se seleccionaron 3 dosis de la vacuna que cubren 1×10^6 equivalentes celulares, 1×10^7 equivalentes celulares, y 1×10^8 equivalentes celulares, respectivamente.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las modalidades de la misma, será

entendido por los expertos en la materia que se pueden hacer diferentes cambios en la forma y en los detalles de las mismas sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

5

REFERENCIAS

1. AmericanCancerSociety. 2008 [citado el 09 de septiembre de 2008]; Disponible en: http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_are_the_key_statistics_for_melanoma_50.asp?sitearea=.
2. (AACR), A.I.o.H.a.W.A.a.A.A.o.c.r., Cancer in Australia 2001, en Cancer Series. 2004, AIHW: Canberra.
3. Cummins, D.L., y colaboradores, Cutaneous malignant melanoma. Mayo Clin Proc, 2006. 81(4): páginas 500-7.
4. Chang, A.E., L.H. Karnell, y H.R. Menck, The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Cancer, 1998. 83(8): páginas 1664-78.
5. AmericanCancerSociety. 2008 06/05/2008 [citado el 06 de septiembre de 2008]; Disponible en: http://wwwv.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_3X_How_is_melanomas_taged_50.asp?sitearea=.
6. Balch, CM., y colaboradores, New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. Semin Surg Oncol, 2003. 21(1): páginas 43-52.

25

7. Atallah, E. y L. Flaherty, Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol*, 2005. 6(3): páginas 185-93.
8. Ang, K.K., y colaboradores, Postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma of the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994. 30(4): páginas 795-8.
9. Lens, M. B. y T.G. Eisen, Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin Pharmacother*, 2003. 4(12): páginas 2205-11.
10. Spiro, T., L. Liu, y S. Gerson, New cytotoxic agents for the treatment of metastatic malignant melanoma: temozolomide and related alkylating agents in combination with guanine analogues to abrogate drug resistance. *Forum (Genova)*, 2000. 10(3): páginas 274-85.
15. 11. Strannegard, O., F. B. Thoren, y E. Lundgren, [Interferon-alpha can improve the prognosis in high-risk melanoma. Combination of surgery, cytostatics and natural IFN-alpha doubled the survival rate], *Lakartidningen*, 2008. 105(6): páginas 358-61.
20. 12. Hauschild, A., y colaboradores, Practical guidelines for the management of interferon-alpha-2b side effects in patients receiving adjuvant treatment for melanoma: expert opinion. *Cancer*, 2008. 112(5): páginas 982-94.
25. 13. Rosenberg, S.A., y colaboradores, Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*, 1994. 271(12): páginas

907-13.

14. Smith, F.O., y colaboradores, Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. Clin Cancer Res, 2008. 14(17): páginas 5610-8.

5 15. Van Houdt, I.S., y colaboradores, Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T- lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. Int J Cancer, 2008. 123(3): páginas 609-15.

10 16. Danson, S. y P. Lorigan, Melanoma vaccines—they should work. Ann Oncol, 2006. 17(4): páginas 539-41.

17. Steinman, R.M. e I. Mellman, Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. Science, 2004. 305(5681): páginas 197-200.

15 18. Wang, T., y colaboradores, Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. Nat Med, 2004. 10(1): páginas 48-54.

19. Seliger, B., Strategies of tumor immune evasion. BioDrugs, 2005. 19(6): páginas 347- 54.

20 20. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, y J.A. Lopez, Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. Immunol Cell Biol, 2005. 83(5): páginas 451-61.

21. Frasca, L., y colaboradores, IFN- γ Arms Human Dendritic Cells to Perform Multiple Effector Functions. J Immunol, 25 2008. 180(3): páginas 1471-1481.

22. Geijtenbeek, T.B., y colaboradores, Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 2000. 100(5): páginas 575-85.
23. Engering, A., y colaboradores, The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *J Immunol*, 2002. 168(5): páginas 2118-2126.
24. Geijtenbeek, T.B.H., y colaboradores, Self- and Nonself-Recognition by C-Type Lectins on Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 2004. 22(1): páginas 33-54.
25. Engering, A., y colaboradores, The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, 2002. 168(5): páginas 2118-26.
26. Tacke, P. J., y colaboradores, Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood*, 2005. 106(4): páginas 1278-1285.
27. Kretz-Rommel, A., y colaboradores, In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models. *J Immunother*, 2007. 30(7): páginas 715-26.
28. Muir, P. D. y F. W. Gunz, A cytogenetic study of eight human melanoma cell lines. *Pathology*, 1979. 11(4): páginas 597-606.
29. Hersey, P., y colaboradores, Adjuvant immunotherapy of patients with high-risk melanoma using vaccinia viral lysates of

melanoma: results of a randomized trial. J Clin Oncol, 2002. 20(20):
páginas 4181-90.

30. Hersey, P., y colaboradores, Prognostic significance of
leukocyte-dependent antibody activity in melanoma patients. J Natl
5 Cancer Inst, 1983. 71(1): páginas 45-53.

31. Hersey, P., y colaboradores, Phase II study of vaccinia
melanoma cell lysates (VMCL) as adjuvant to surgical treatment of
stage II melanoma. II. Effects on cell mediated cytotoxicity and
leucocyte dependent antibody activity: immunological effects of
10 VMCL in melanoma patients. Cancer Immunol Immunother, 1986.
22(3): páginas 221-31.

32. Hersey, P., y colaboradores, Evidence that treatment with
vaccinia melanoma cell lysates (VMCL) may improve survival of
patients with stage II melanoma. Treatment of stage II melanoma with
15 viral lysates. Cancer Immunol Immunother, 1987. 25(3): páginas 257-
65.

33. Altin, J.G., y colaboradores, Synthesis of NTA3-DTDA "A"
A Chelator-Lipid that Promotes Stable Binding of His-Tagged
Proteins to Membranes. Australian Journal of Chemistry, 2006. 59(5):
20 páginas 302-306.

34. Van Broekhoven, C. L., y colaboradores, Engrafting
costimulator molecules onto tumor cell surfaces with chelator lipids:
a potentially convenient approach in cancer vaccine development. J
Immunol, 2000. 164(5): páginas 2433-43.

25 35. Van Broekhoven, CL. y J. G. Altin, A novel system for

convenient detection of low-affinity receptor-ligand interactions: chelator-lipid liposomes engrafted with recombinant CD4 bind to cells expressing MHC class II. *Immunol Cell Biol*, 2001. 79(3): páginas 274-84.

- 5 36. Van Broekhoven, CL. y J.G. Altin, A novel approach for modifying tumor cell-derived plasma membrane vesicles to contain encapsulated IL-2 and engrafted costimulatory molecules for use in tumor immunotherapy. *Int J Cancer*, 2002. 98(1): páginas 63-72.

- 10 37. Van Broekhoven, C.L., y colaboradores, Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res*, 2004. 64(12): páginas 4357-65.

- 15 38. Van Broekhoven, CL. y J.G. Altin, The novel chelator lipid 3(nitrilotriacetic acid)-ditetradecylamine (NTA(3)-DTDA) promotes stable binding of His-tagged proteins to liposomal membranes: potent anti-tumor responses induced by simultaneously targeting antigen, cytokine and costimulatory signals to T cells. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1716(2): páginas 104-16.

- 20 39. U.S.DepartmentofHealthandHumanServices, Report on Carcinogens 2008.

40. Sciences, N.A.o., Dietary Reference Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. 2000, Washington: National Academy Press.

- 25 41. Sunderman, F. W., Jr., Potential toxicity from nickel

contamination of intravenous fluids. Ann Clin Lab Sci, 1983. 13(1):
páginas 1-4.

42. Baribaud, F., y colaboradores, Functional and antigenic
characterization of human, rhesus macaque, pigtailed macaque, and
5 murine DC-SIGN. J Virol, 2001. 75(21): páginas 10281-9.

43. Jameson, B., y colaboradores, Expression of DC-SIGN by
dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and
rhesus macaques. J Virol, 2002. 76(4): páginas 1866- 75.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - a) uno o más antígenos;
 - 5 b) un solo dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN; y
 - c) un vehículo, el cual es portador de a) y b).
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, la
10 cual comprende además, d) un factor inmunomodulador.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde: a) uno o más antígenos se derivan a partir de vesículas de membrana (MVs).
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las vesículas de membrana comprenden antígenos asociados con membrana.
- 20 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los antígenos asociados con membrana son antígenos tumorales.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en
25 donde los antígenos asociados con membrana comprenden antígenos

tumorales seleccionados a partir del grupo consistente en los antígenos de diferenciación de melanoma de tirosinasa, gp100 y MART-1, y los antígenos de cáncer de testículos MAGE-A3, MAGE A-10, BAGE, GAGE, y XAGE.

5

7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las vesículas de membrana se derivan a partir de células tumorales, células de melanoma, o células de melanoma MM200.

10

8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es un fragmento de dAb de la cadena pesada.

15

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es un fragmento de dAb V_H .

20

10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 (DMS5000).

25

11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN comprende además una cola C-terminal de polihistidina.

5

12. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el vehículo es un liposoma.

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el liposoma comprende constituyentes liposomales.

10

14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en donde los constituyentes liposomales comprenden el lípido quelante de 3(ácido nitrilo-triacético)-ditetradecil-amina (3NTA-DTDA).

15

15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en donde los constituyentes liposomales comprenden sulfato de níquel (NiSO_4).

20

16. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde los constituyentes liposomales comprenden el lípido de α -palmitoil- β -oleoil-fosfatidil-colina (POPC)).

17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, en donde el factor inmunomodulador es la

25

citoquina de interferón gamma (IFN-gamma).

18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la composición es una composición de vacuna.

19. Un método para la elaboración de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, el cual comprende:

- i) preparar vesículas de membrana;
- ii) preparar el constituyente liposomal;
- iii) combinar las vesículas de membrana y el constituyente liposomal con el factor inmunomodulador; y
- iv) agregar el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la preparación de las vesículas de membrana es mediante la propagación de las células tumorales, sonicación y preparación de los gránulos de membrana mediante centrifugación y resuspensión en suero regulado con fosfato.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, en donde el constituyente liposomal se prepara mediante la mezcla de POPC y Ni-3NTA-DTDA.

22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, el cual comprende además complementar con níquel.

5 23. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para utilizarse como un medicamento.

24. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para utilizarse en el tratamiento de cáncer.
10

25. La composición de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el cáncer es melanoma.

26. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, para administración intravenosa.
15

27. Un método para el tratamiento de un tumor en un sujeto, el cual comprende administrar una composición como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
20

28. Una composición o un método como se reclama en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el único dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es uno que tiene la misma especificidad de enlace que un solo dominio variable de
25 inmunoglobulina anti-DC-SIGN que tiene la secuencia de

aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 1 ó 3.

29. Una composición o un método como se reclama en
cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el único
5 dominio variable de inmunoglobulina anti-DC-SIGN es uno que tiene
las mismas secuencias de las regiones determinantes de
complementariedad (CDR) que la secuencia de aminoácidos
estipulada en la SEQ ID NO: 1 ó 3.

10

* * * * *

15

20

25

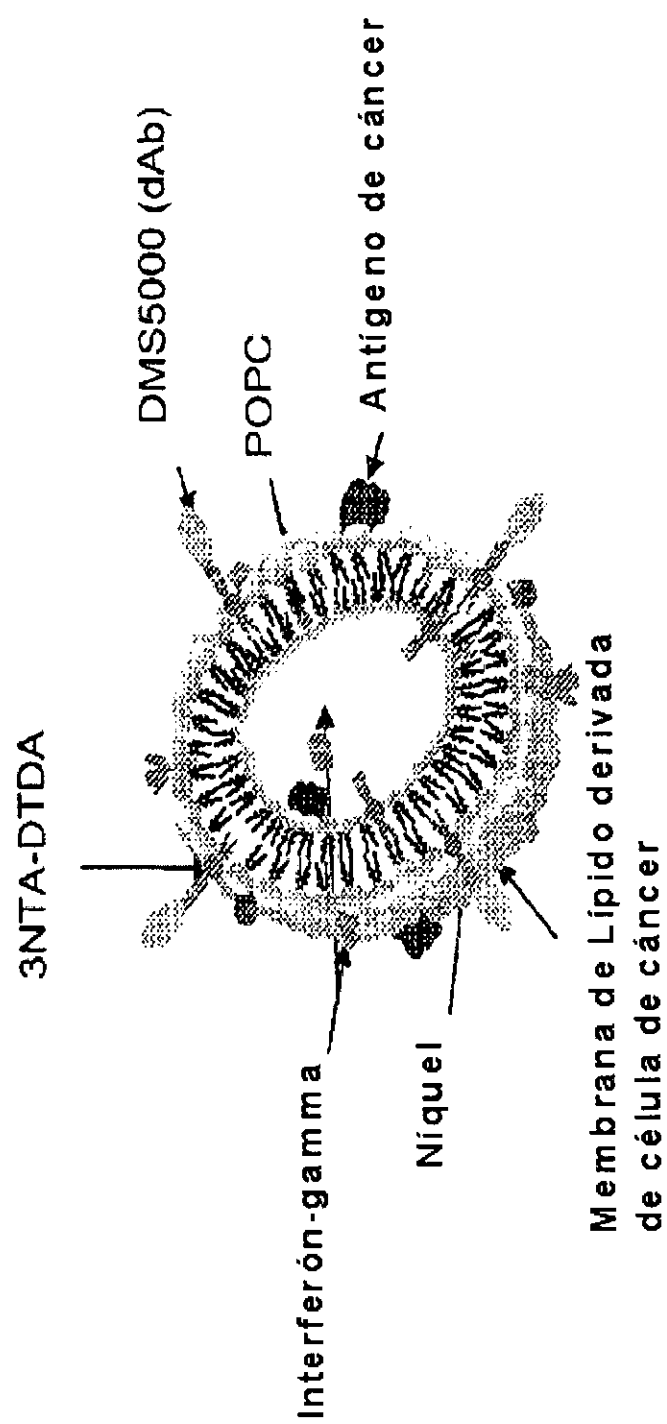


FIG. 1

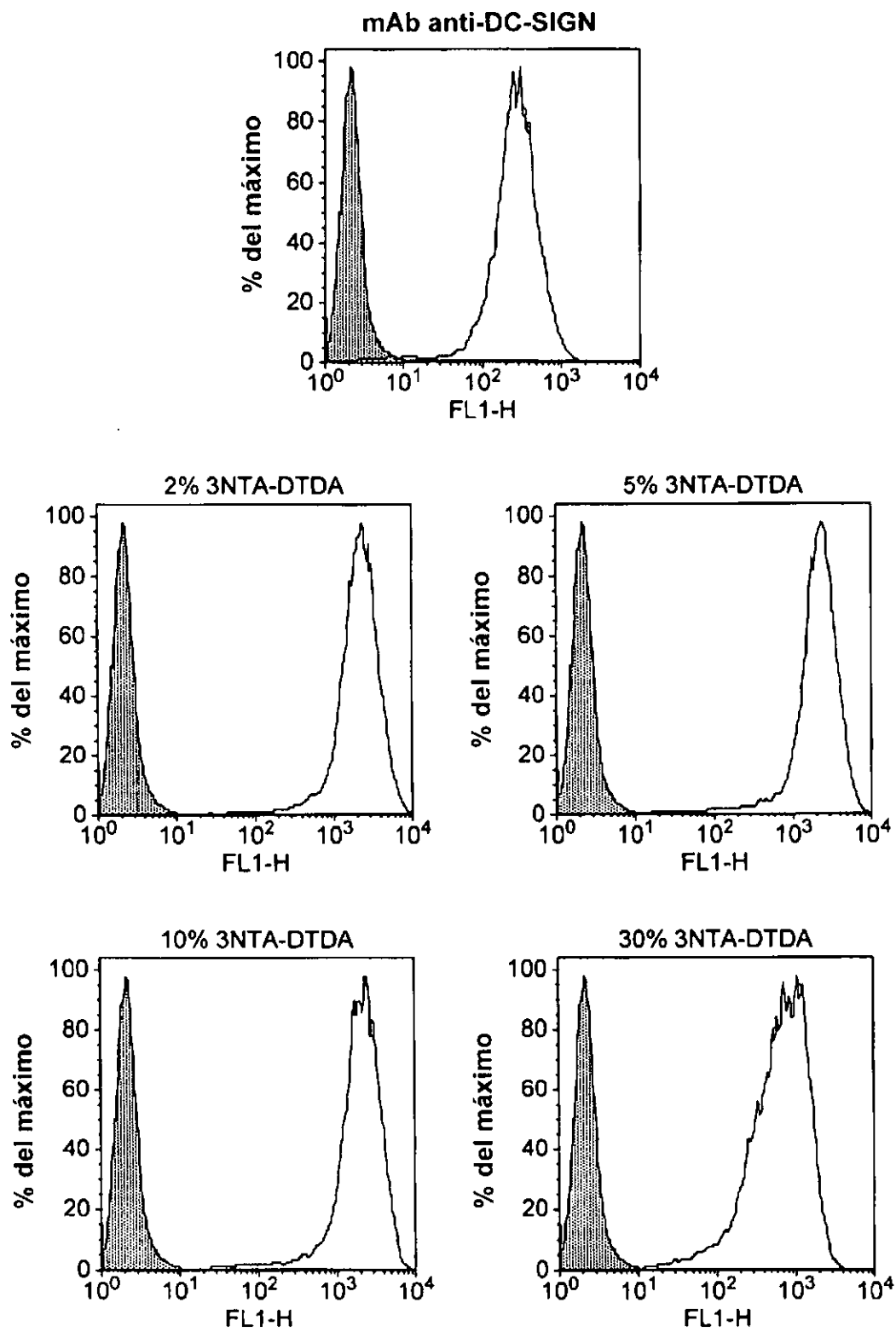


FIG. 2

102



FIG. 3

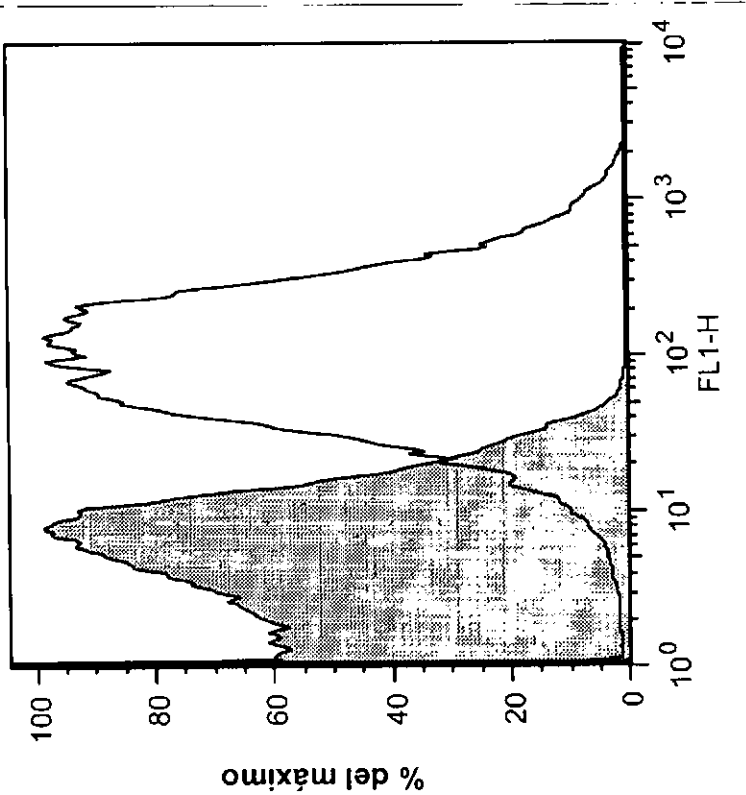


FIG. 4

114

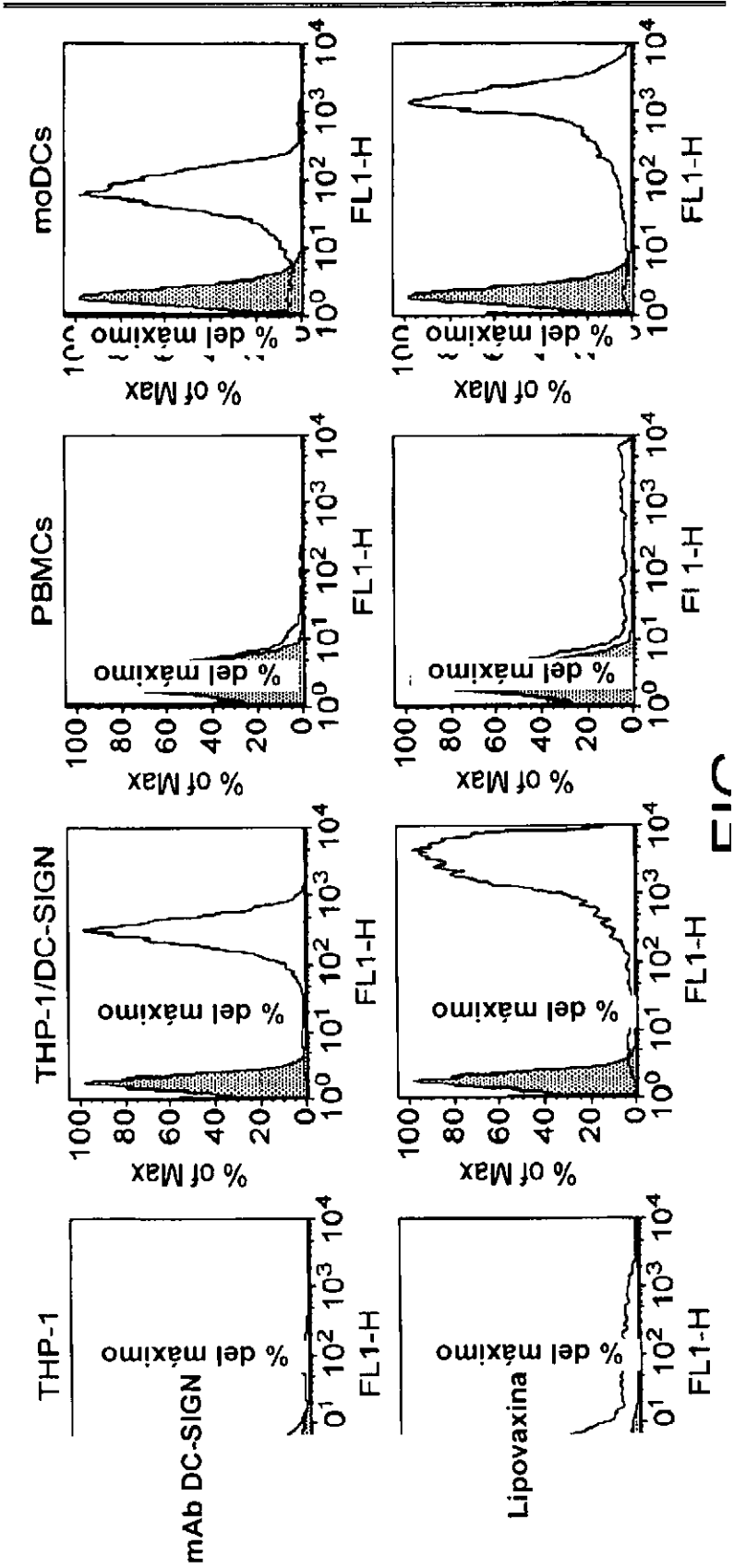


FIG. 5

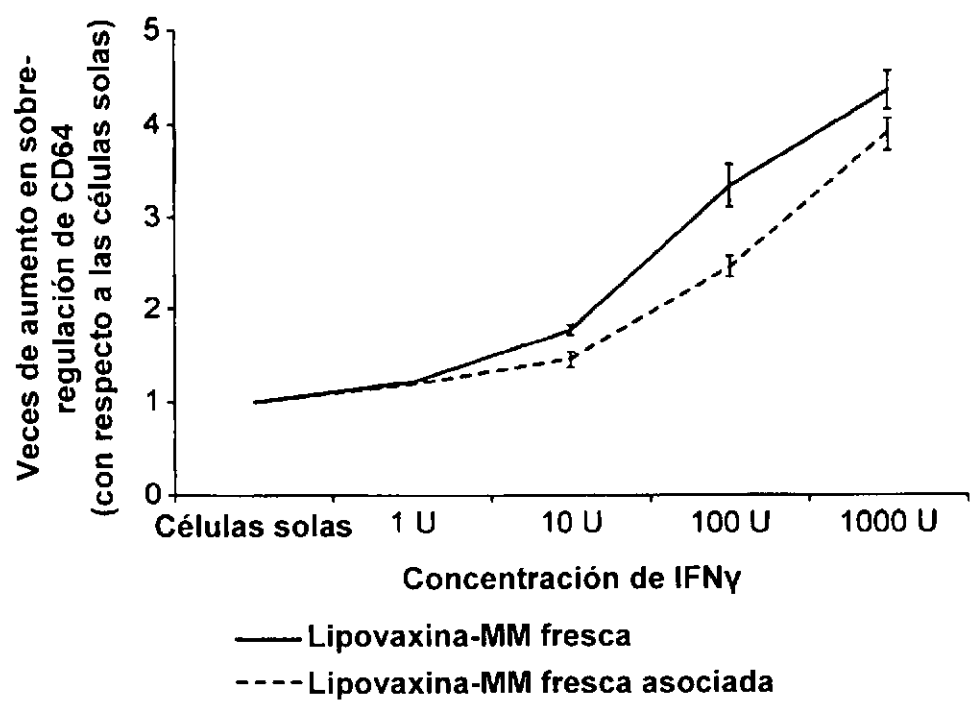
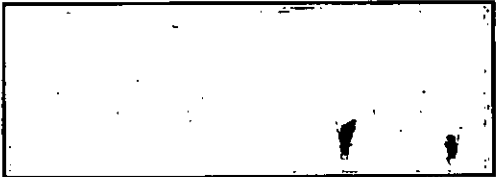
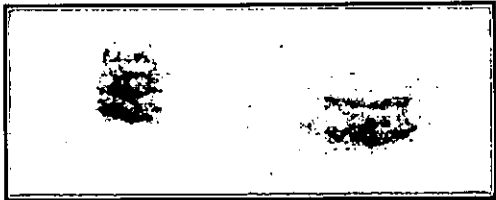


FIG. 6

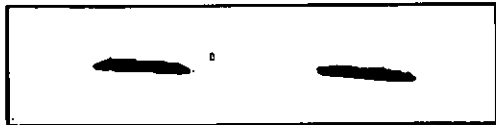
Pan Cadherina



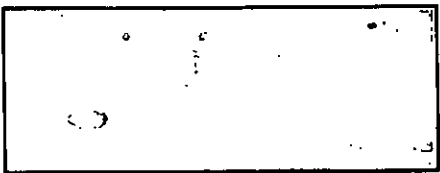
Gp 100



Melan-A



Tirosinasa



MM200
Lisado celular

MM200
MV

FIG. 7

117

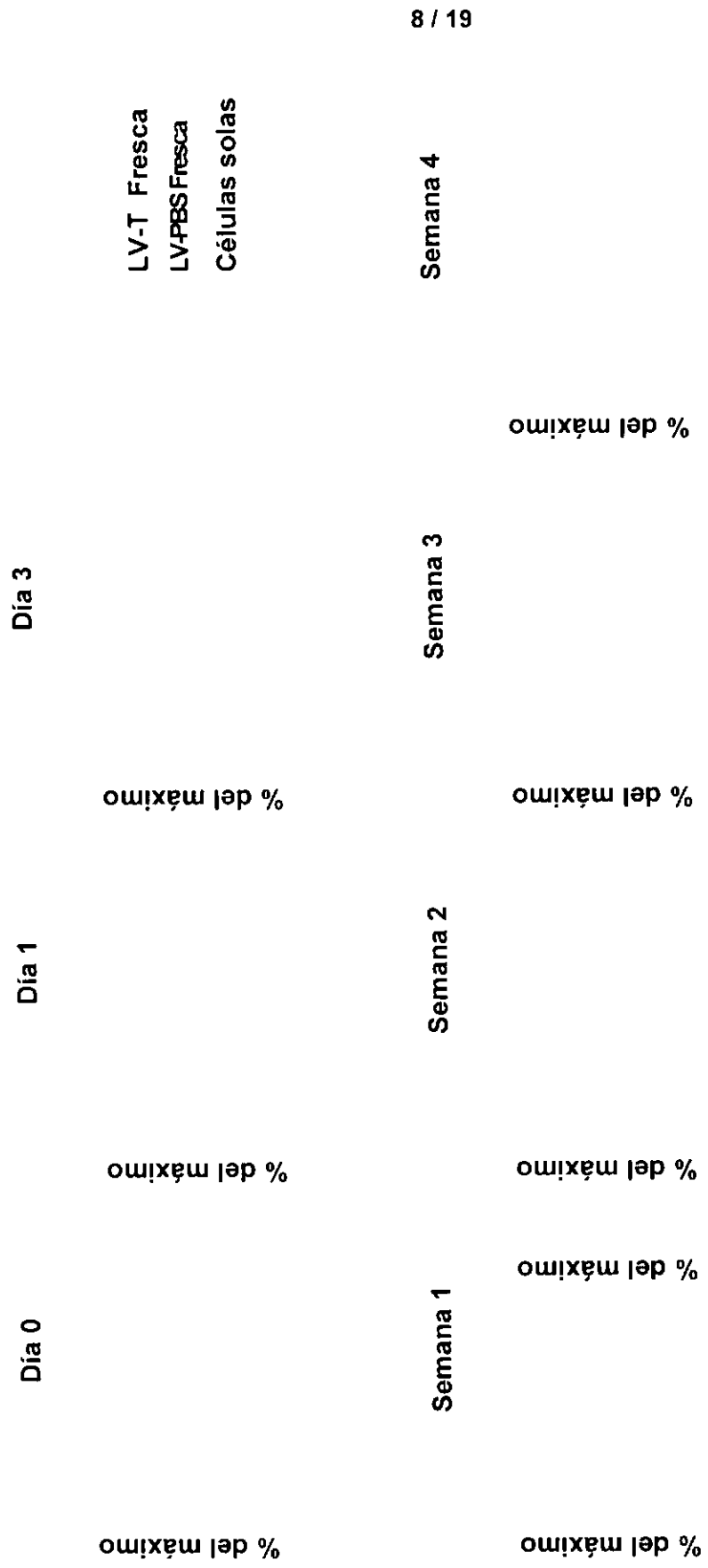
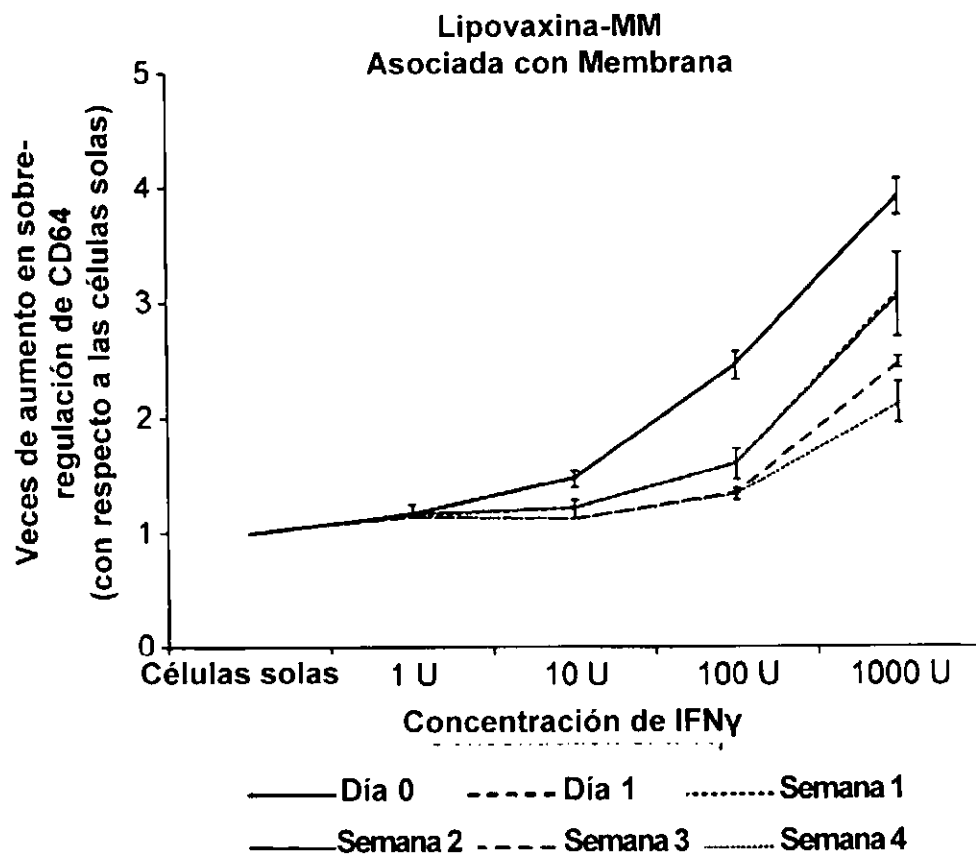
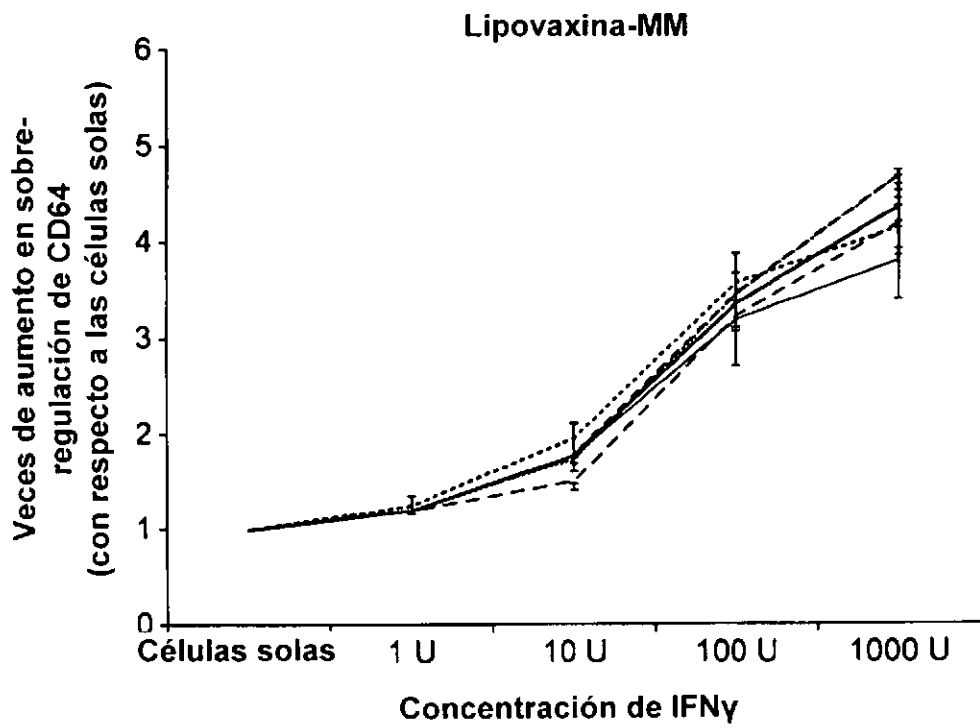


FIG. 8

1118

**FIG. 9**

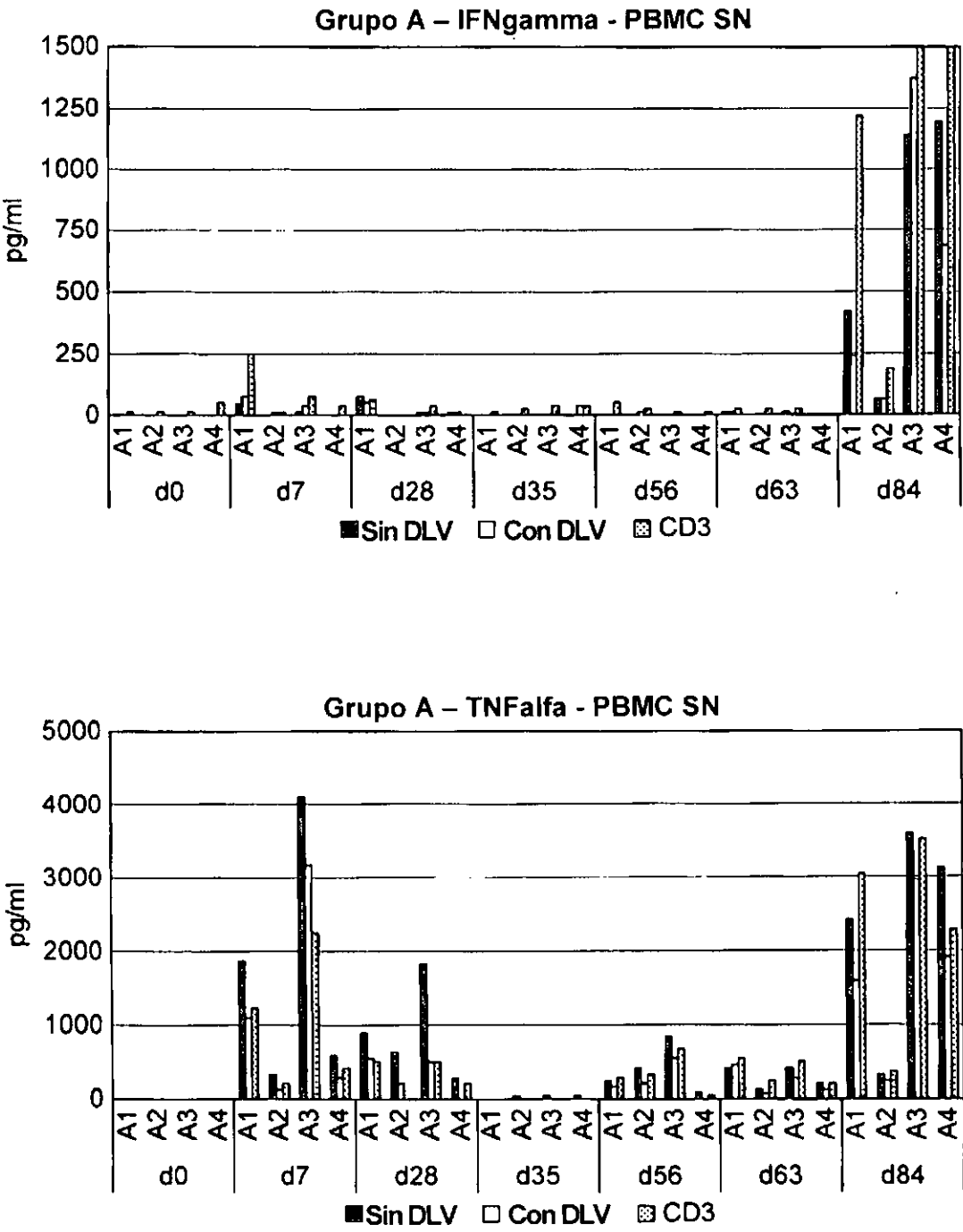


FIG. 10

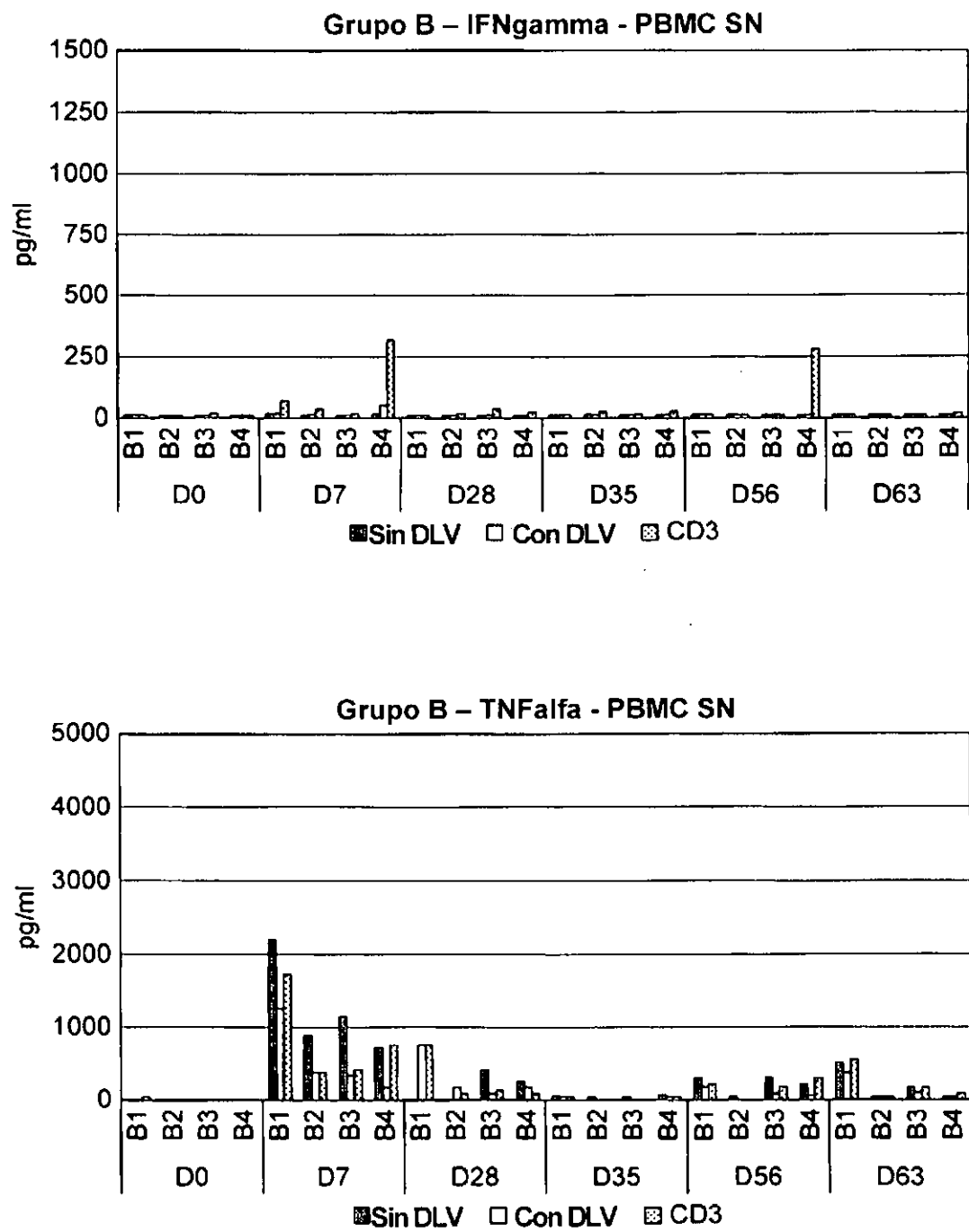


FIG. 10 Cont.

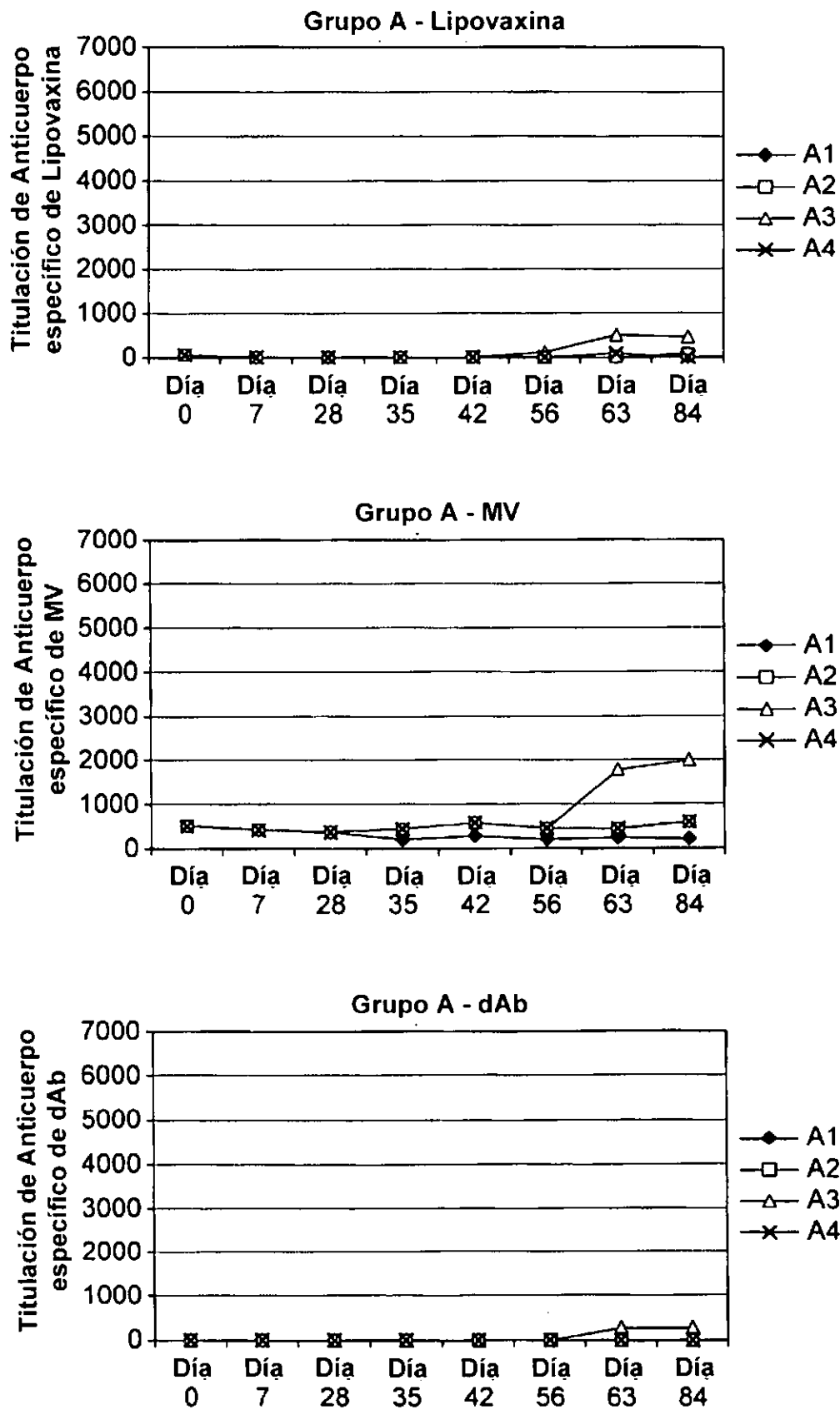


FIG. 11

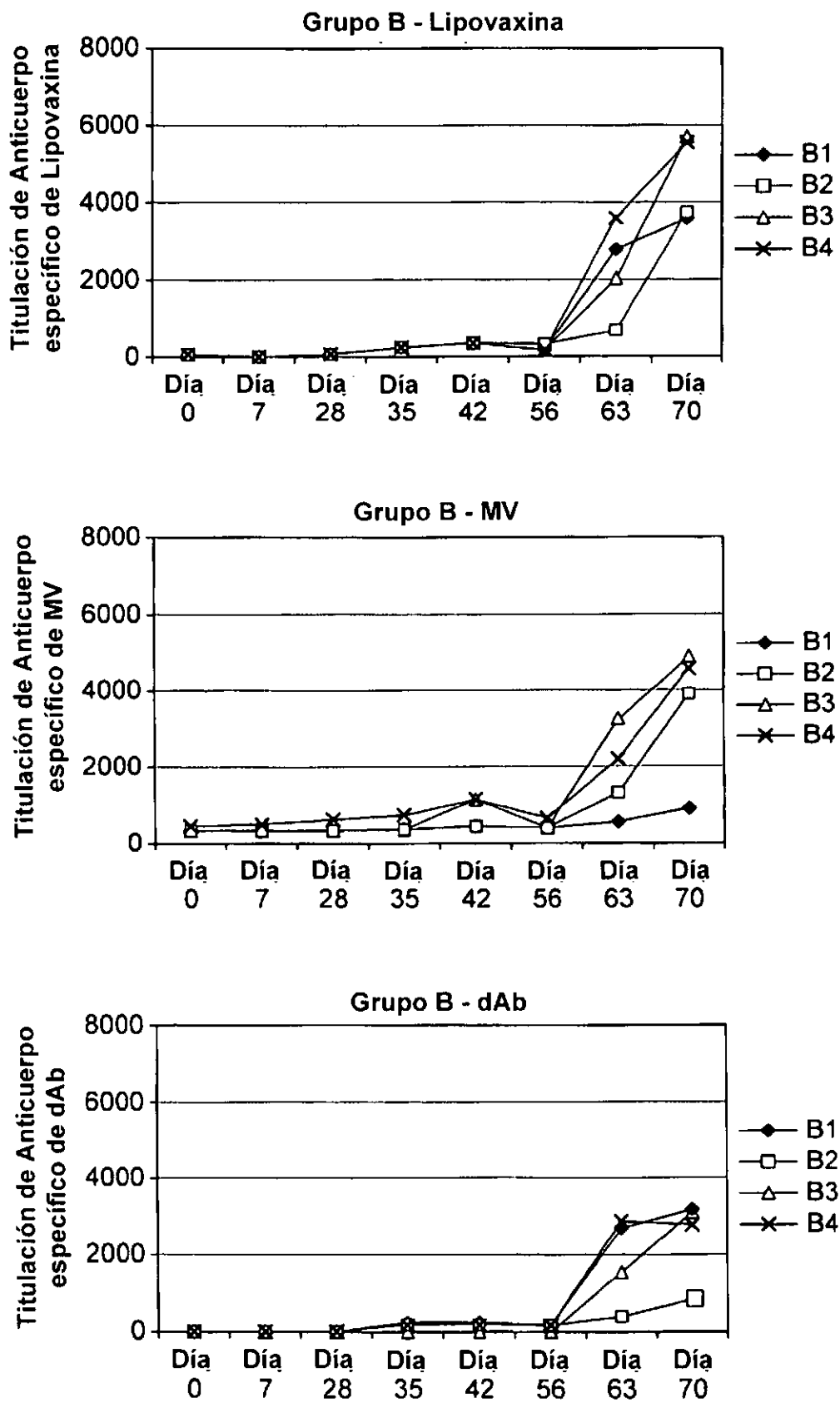


FIG. 11 Cont.

Secuencia DMS5000

Sin la marca-His:

STEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDRRAMGWVRQAPGKGLEWVSSIESDGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPGSSYVFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

Con la marca-His (Subrayado):

STEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDRRAMGWVRQAPGKGLEWVSSIESDGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPGSSYVFDYWGQGLVTVSSGHHGHGHGHGH (SEQ ID NO: 2)

DMS5000 sin ST:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDRRAMGWVRQAPGKGLEWVSSIESDGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCAKHPGSSYVFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

FIG. 12

Composición y características de los componentes de pre-formulación de Lipovaxina-MM

Componente de Pre-mezcla				A	B	C	D
Nombre Nombre Comercial Composición/descripción o estructura si es aplicable	Nombre	Vesículas MM200	Liposoma	IFN-gamma	DMS5000	N/A	Proteína recombinante
	Nombre Comercial	N/A	N/A	IMUKIN (Boehringer Ingelheim)	N/A		
	Composición/descripción o estructura si es aplicable	Fracción de membrana que forma vesículas multilamelares cuando se vuelve a suspender en suero regulado con fosfato (PBS)	3NTA-DTDA	Citoquina IFN-gamma	Anticuerpo de dominio-V (dAb) anti DC-SIGN humano solubilizado en suero regulado con fosfato (PBS)		

FIG. 13

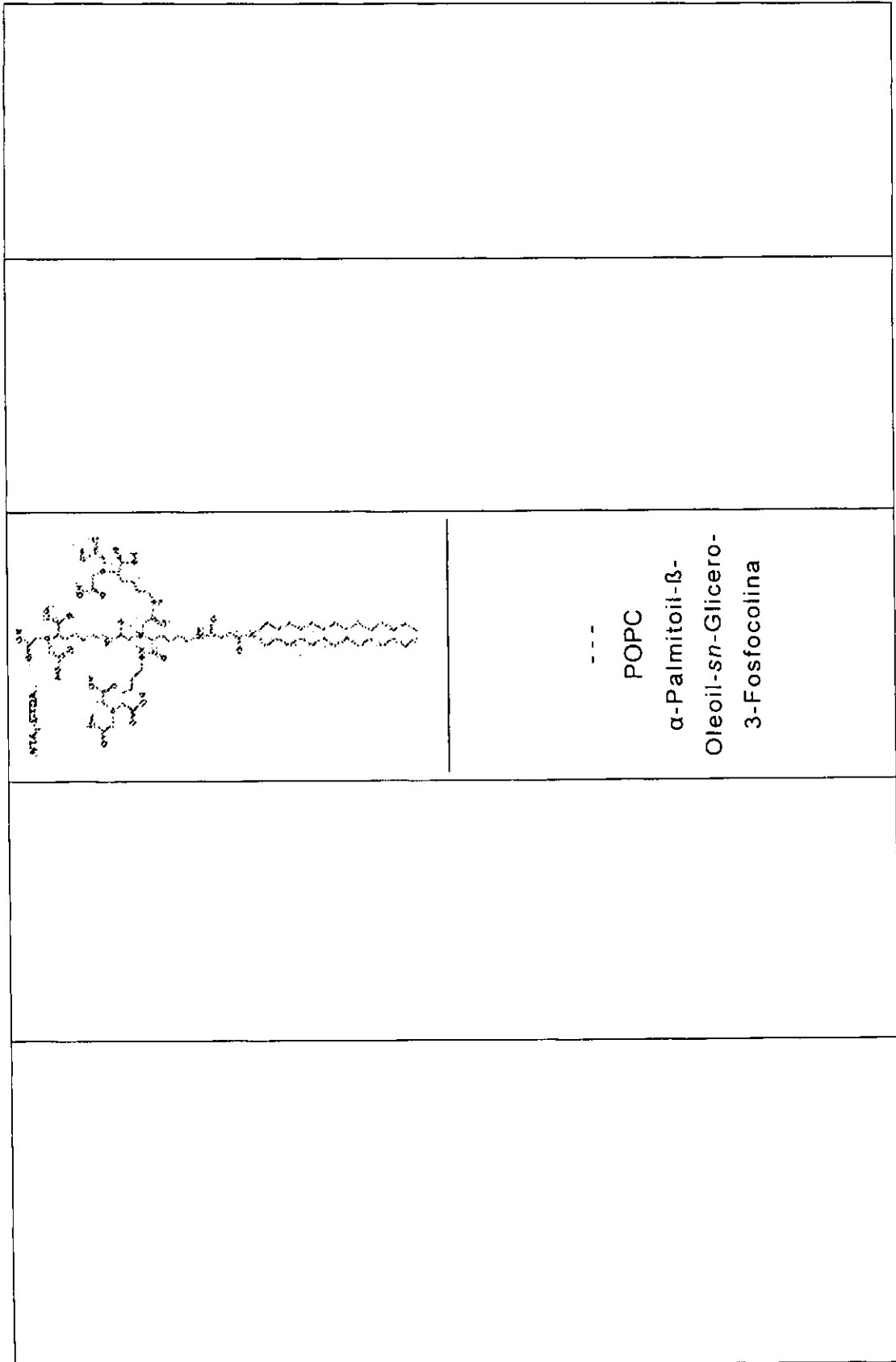


FIG. 13(cont.)

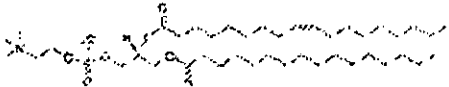
				
		--- NiSO₄ Hidrato de sulfato de níquel (II) (CAS# 15244-37-8) EINECS Número: 232-104-9 EU Número: 028-009-00-5		
Fórmula Molecular (si es aplicable)	N/A	3NTA-DTDA: C ₇₂ H ₁₂₇ N ₉ O ₂₃	N/A	N/A

FIG. 13(cont.)

		POPC: $C_{42}H_{82}NO_8P$ $NiSO_4$: $NiSO_4 \cdot 6H_2O$		
Peso Molecular	N/A	3NTA-DTDA: 1486.8418 POPC: 760.10 $NiSO_4$: 154.77 (anhidro)	Monómeros de 16,465 Dáltones	14,386 kDa
Descripción	Las vesículas son estructuras multilamelares enlazadas con membrana de diferentes tamaños que se forman espontáneamente	Los liposomas se preparan a partir de una mezcla de soluciones de lípido esterilizadas formuladas en PBS complementado con sulfato de níquel.	IMUKIN es una solución estéril altamente purificada consistente en dímeros no covalentes de dos monómeros idénticos de 16,465	

FIG. 13(cont.)

	cuando la fracción de membrana recolectada a partir de las células MM200 que se han alterado mediante sonicación, se vuelve a suspender en una solución acuosa. La producción se conduce bajo condiciones asépticas.	La mezcla estéril se liofiliza y se almacena al vacío a -20°C.	Dáltones, con una actividad específica de 20 millones de IU/mg. Los excipientes incluyen manitol, succinato de sodio, ácido succínico, polisorbato 20, y agua para inyecciones.	
Solubilidad	Suspensión	Suspensión	Soluble en PBS	Soluble en PBS

FIG. 13(cont.)

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Domantis Limited
	Lipotek Pty Ltd
5	De Wildt, Rudolf
	Altin, Joseph
	Parish, Christopher
	Price, Jason
	Atmosukarto, Ines
10	<120> Composición para dirigirse a las células dendríticas
	<130> DB00061 WO
	<150> US 61/107,095
	<151> 2008-10-21
	<160> 3
15	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
	<210> 1
	<211> 121
	<212> PRT
20	<213> Secuencia Artificial
	<400> 1
	Ser Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
	1 5 10 15
	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
25	20 25 30

Arg Arg Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ser Ser Ile Glu Ser Asp Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp
 5 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 10 Tyr Cys Ala Lys His Pro Gly Ser Ser Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15 <210> 2
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 2
 20 Ser Thr Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
 20 25 30
 Arg Arg Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 25 35 40 45

Trp Val Ser Ser Ile Glu Ser Asp Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 5 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Lys His Pro Gly Ser Ser Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly His His Gly His His Gly
 115 120 125
 His His Gly His His Gly His His
 130 135
 15 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 3
 20 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Arg Arg
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 25 35 40 45

Ser Ser Ile Glu Ser Asp Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys His Pro Gly Ser Ser Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
10 115

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐ Indicación que solicita una patente

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

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

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

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

1 ☒

Indicación que se solicita una PCT

25 ☒

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

AAA ☒

Dibujos de ser estos pertinentes.

2 ☒

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

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial

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

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

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

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

☐ Representación grafica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD

REFERENCIA	Radicación No.	11 050436
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/63656
	Fecha inicio fase nacional	21/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	009725

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

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

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

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 7 JUN 2011
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
DOMANTIS LIMITED Y LIPOTEK PTY LTD

REFERENCIA	Radicación No.	11 050436
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/63656
	Fecha inicio fase nacional	21/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	009726

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 JUN 2011
adpa11