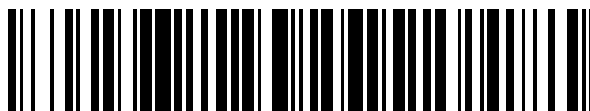


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 130**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08757902 .5**
96 Fecha de presentación: **26.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2184072**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

54 Título: **Producción de una preparación de vacuna homogénea para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:
29.06.2007 CU 20070154

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.04.2012

73 Titular/es:
**CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
CALLE 216 ESQ. A 15 ATABEY PLAYA, HABANA
11600
CUBA CIUDAD DE LA HABANA 11600, CU**

72 Inventor/es:
**RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, Gryssell María;
VIÑA RODRÍGUEZ, Lisel;
CALVO GONZÁLEZ, Loany;
CUEVAS FIALLO, Ariadna;
CHICO VELIZ, Ernesto;
CROMBET RAMOS, Tania;
ALBISA NOVO, Airama;
GONZÁLEZ MARINELLO, Gisela María y
LAGE DÁVILA, Agustín Bienvenido**

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 379 130 T3

DESCRIPCIÓN

Producción de una preparación de vacuna homogénea para el tratamiento del cáncer

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la biotecnología, en particular relacionada con la salud humana. En una realización, la presente invención describe vacunas del cáncer protectoras y/o terapéuticas, principalmente composición de vacunas para provocar un aumento significativo de la respuesta inmunológica contra el factor del crecimiento epidérmico (EGF), cuya importancia oncológica se ha demostrado con amplitud, principalmente para el crecimiento de tumores de origen epitelial.

Técnica anterior

10 El sistema del receptor de EGF (EGFR), incluyendo los ligandos, es un complejo molecular que regula de modo específico el crecimiento celular y sus efectos sobre el crecimiento incontrolado de tumores epiteliales.

En el proceso tumorigénico, la desregulación de procesos paracrinos y autocrinos para la activación del EGRF implica la sobreexpresión de los factores del crecimiento, así como una mayor síntesis y/o mutación de los receptores.

15 El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos con un peso molecular aparente de 6045 Da. Este péptido fue aislado y purificado por primera vez por Cohen S., J. Biol. Chem., 20 (1962), 237, 1.555.

20 El EGF es un miembro de la familia de ligandos del EGFR; esta familia comprende proteínas relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional. Otros miembros de la familia son el factor del crecimiento transformante (TGF), la anfirregulina (AR), el criptol (CR1), el factor del crecimiento de unión a heparina, la betacelulina y la efirregulina. Por otra parte, la familia de los poxvirus incluye proteínas relacionadas con el EGF; entre estas, la más caracterizada es el factor del crecimiento del virus de vaccinia (VGF).

Todas estas moléculas son capaces de unirse a EGFR con la consiguiente activación del receptor, de modo que se conocen como ligandos de EGFR y desempeñan un papel en el crecimiento de células normales y tumorales.

25 El EGFR es una glicoproteína de 170 kDa; el gen ya ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular de este receptor está asociado con la actividad tirosina quinasa de moléculas que muestran una homología estructural con las proteínas codificadas por el oncogén v-erb-B, y están implicadas en los procesos de transformación malignos (Heldin, C.H. (1984), Cell, 37, 9-20).

Las pruebas experimentales de los últimos años acerca de la relación entre el EGFR y su sistema de ligandos con el cáncer hacen que sea una diana muy atractiva para la inmunoterapia del cáncer.

30 Resultados previos han demostrado la eficacia en el cáncer de la inmunoterapia activa con una vacuna basada en EGF. De hecho, se han obtenido pruebas preclínicas y clínicas sobre la inmunogenicidad y la carencia de toxicidad producida por la vacunación con el hrEGF unido a una proteína portadora (González et al. (1996), Vaccine Research, 5(4), 233-243).

35 El documento EP 0657175 describe una composición de vacuna que comprende EGF autólogo acoplado con una proteína portadora que inhibe el crecimiento de tumores dependientes de EGF a través de un efecto autoinmunológico.

40 La composición de vacuna descrita en el documento EP 0657175 consiste en vacunas conjugadas que comprenden el EGF acoplado a una proteína portadora (la proteína P64K, la cadena B de la toxina del cólera, la proteína del toxoide tetánico y/o anticuerpos monoclonales) y, como consecuencia, se obtiene una mezcla heterogénea y poco reproducible de especies conjugadas. La nueva composición de vacuna descrita en la presente invención comprende el EGF autólogo como principio activo, y se caracteriza porque tiene una composición química homogénea con una pureza definida, que provoca una mayor inmunogenicidad, una actividad clínica sustancialmente mayor y con menores inmunizaciones para obtener un efecto terapéutico.

45 El menor contenido en antígenos autólogos en la composición de vacuna de la presente invención sorprendentemente no induce unos menores títulos de anticuerpos EGF en seres humano; al contrario, más bien induce un aumento significativo de los títulos de anticuerpos anti-EGF. La menor cantidad de contenidos de EGF y sus derivados en la composición de vacuna se obtuvo desarrollando un método de purificación basado en la filtración de membranas, que también es un objeto de la presente invención.

50 Además, la presente invención proporciona una composición de vacuna homogénea y reproducible con un mayor efecto clínico y menos inmunizaciones, lo cual significa una gran ventaja para la terapia del cáncer y para el paciente, en comparación con las composiciones de vacunas previamente descritas.

La composición de vacuna de la presente invención también puede comprender adyuvantes apropiados, tales como hidróxido de aluminio o Montanide.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento sanitario para la fabricación de dicha composición de vacuna, apropiado para su uso en seres humanos por la vía parenteral.

- 5 El procedimiento comprende un método adecuado para la conjugación covalente del hrEGF con la proteína portadora P64K, y la purificación del conjugado utilizando membranas de ultrafiltración en el intervalo de 50-100 kDa, para eliminar las especies biológicamente inactivas conjugadas (sin actividad inmunogénica), así como otras impurezas químicas.

Descripción detallada de la invención

- 10 La presente invención describe una nueva composición de vacuna basada en el EGF autólogo, teniendo dicha composición de vacuna una composición química homogénea con una pureza definida, que es capaz de provocar una mayor inmunogenicidad y una actividad clínica sustancialmente mayor. Cuando deba aumentarse la dosis terapéutica, con el procedimiento para obtener la composición de vacuna de la presente invención es posible aumentar la concentración de las especies conjugadas de hrEGF-rP64K (conocida como potencia) sin aumentar el número de inyecciones.

De modo sorprendente, los inventores han descubierto que cuando se disminuye el contenido del antígeno autólogo mediante un nuevo procedimiento de purificación, la composición de vacuna de la presente invención es capaz de provocar un aumento significativo de la respuesta inmunológica contra el EGF autólogo, en comparación con las vacunas basadas en EGF heterogéneas previamente documentadas.

- 20 La composición de vacuna obtenida por la disminución en el contenido del antígeno autólogo a través de una metodología de purificación por membranas de ultrafiltración tiene una composición homogénea, en la que la especie inmunológicamente activa (especie conjugada de hrEGF-rP64K) tiene un peso molecular mayor que 60 kDa. Esta composición de vacuna muestra un perfil cromatográfico de exclusión molecular que se caracteriza porque la especie que presenta la actividad biológica representa más del 90% del área total del cromatograma, que se corresponde con la composición de vacuna total, tal como se muestra en la figura 4.

- 25 Un análisis de espectrometría de masas de la presente composición de vacuna ha revelado sus características estructurales. Los mapas peptídicos de dos lotes diferentes muestran una alta homología entre los lotes en la posición s, así como en la proporción (figura 5). Esta alta homología entre los lotes confirma la precisión de los parámetros de la configuración química, así como de los procedimientos de purificación, describiéndose ambos en la presente invención. El análisis de espectrometría de masas también revela la secuencia de los péptidos principales derivados de la composición de vacuna de la presente invención (tabla 3).

En la presente composición de vacuna, la proporción de conjugación entre las proteínas EGF y de P64K es de 1:2, lo cual significa 2 moléculas de EGF por molécula de P64K.

Metodología para obtener la composición de vacuna

- 35 **Procedimiento de purificación para disminuir el contenido en EGF autólogo**

Comenzando a partir de observaciones experimentales que prueban que una disminución en el contenido en hrEGF en la composición de vacuna aumenta su acción inmunológica, se ha desarrollado un método para disminuir el contenido en hrEGF en la mezcla heterogénea de conjugados, enriqueciendo la composición de vacuna en especies conjugadas de alto peso molecular (especies inmunológicamente activas) y estando exenta de glutaraldehído.

- 40 El procedimiento de purificación que emplea membranas de ultrafiltración en un intervalo de aproximadamente 50-100 kDa desarrollado y descrito en la presente invención consiste en dos etapas: en la etapa inicial, se realizan cambios sucesivos de la disolución tampón (diafiltración) para eliminar el glutaraldehído y para eliminar el exceso de proteína autóloga libre o que forma conjugados de hrEGF-hrEGF de diferentes tamaños; durante esta etapa se realizan entre 10 y 15 cambios de la disolución tampón. La segunda etapa es la concentración del conjugado químico purificado, en el que más del 90% de su composición corresponde a las especies inmunogénicas hrEGF-rP64K. Durante la etapa de concentración, el volumen inicial del conjugado químico se reduce hasta alcanzar una concentración de proteínas final (especies conjugadas de hrEGF-rP64K) en un intervalo de aproximadamente 1-12 mg/ml. Esta versatilidad en el intervalo de concentraciones del principio activo (miligramos totales del conjugado de hrEGF-rP64K por mililitros) para esta composición de vacuna es una gran ventaja para la terapia del cáncer. Esto permite aumentar la dosis de tratamiento sin que implique que el paciente aumente la frecuencia de la inmunización y/o se aumente el número de sitios de inmunización.

- 55 Con el fin de controlar la calidad de la purificación del conjugado químico se evaluó el pH y la conductividad del retenido y del permeado. También se determinó la concentración de proteínas mediante el método descrito en Lowry D.H. et al., J. Biol. Chem., 191:495-498, 1951, y se determinó el porcentaje de homogeneidad a partir del análisis de la cromatografía de filtración en gel (HPLC-FG).

La singularidad de esta metodología asegura que la composición de vacuna obtenida tiene una composición homogénea y una pureza definida, que se caracteriza por la presencia principalmente de especies inmunológicamente activas, el conjugado de hrEGF-rP64K.

5 De modo sorprendente, la eliminación del exceso de proteína autóloga (hrEGF) libre o polimérica no provoca la reducción, sino que permite aumentar significativamente la concentración de anticuerpos anti-EGF (a una dilución 1/1000) hasta 10 veces más que la obtenida cuando se inmunizan ratones con polímeros de hrEGF y con hrEGF libre. La reducción en el contenido de proteínas autólogas en la composición de vacuna provoca en el paciente unos aumentos de al menos 2 veces del título máximo de anticuerpos anti-EGF. Este incremento de los títulos de anticuerpos se observa incluso en aquellos pacientes que reciben la mitad de dosis por inmunización (2,4 mg), en comparación con los pacientes que reciben una dosis de 4,8 mg por dosis de la composición de vacuna descrita en el documento EP 0657175. Estos resultados indican que la composición de vacuna descrita en la presente invención tiene mayor actividad inmunológica por miligramo de proteína inmunológicamente activa, comparado con otras composiciones de vacuna.

15 **Obtención de un conjugado químico entre la proteína recombinante de P64K (rP64K) y el factor del crecimiento epidérmico humano recombinante (hrEGF)**

Comenzando a partir de la evaluación y la optimización de las condiciones para la reacción de conjugación química entre las proteínas hrEGF y rP64K se desarrolla un método de conjugación que requiere una alta proporción molar de la proteína autóloga, 10 moles de hrEGF por cada mol de rP64K, para garantizar una alta eficacia de conjugación entre ambas. El exceso necesario de proteína autóloga durante la conjugación química, que garantiza esta eficacia, se elimina posteriormente mediante el método de purificación con membranas de ultrafiltración según se ha descrito previamente, que permite obtener una composición de vacuna con alta homogeneidad. El procedimiento descrito en la presente invención para garantizar una conjugación química apropiada entre ambas proteínas consiste en una única etapa y comienza mezclando la proteína hrEGF previamente concentrada (> 6 mg/ml) y la proteína rP64K (\geq 1 mg/ml) en el reactor de conjugación. A esta mezcla de proteínas se le añade una disolución de PBS/MgCl₂ (pH 6,8-7,2) y la disolución de conjugación de glutaraldehído al 0,5%. La mezcla se mantiene en agitación constante durante 25 2 horas a una temperatura de 22 °C \pm 2 °C. La concentración de proteínas final en la mezcla de reacción para el hrEGF es de 0,82 mg/ml, y para la proteína rP64K de 0,89 mg/ml. La concentración de proteínas totales durante la reacción de conjugación es de 2 mg/ml, y la concentración final de glutaraldehído en la mezcla de reacción es del 0,05%.

30 La composición de vacuna según la presente invención puede emplearse junto con adyuvantes apropiados, tales como hidróxido de aluminio o Montanide.

En otro aspecto, la presente invención implica un procedimiento sanitario para obtener una composición de vacuna, que va a ser administrada por la vía parenteral, procedimiento que minimiza las oportunidades de contaminación microbiana de la composición de vacuna durante la conjugación, permitiendo realizar la metodología de purificación del conjugado químico en unas pocas horas y facilitando el incremento del volumen de la composición de vacuna que se va a obtener, entre otras ventajas. Los siguientes ejemplos ilustran más en detalle la presente invención.

40 El ejemplo 1 describe la caracterización molecular de la composición de vacuna descrita en la presente invención. La caracterización molecular incluye la identificación cromatográfica mediante HPLC-FG de las especies conjugadas formadas durante la reacción de conjugación, la determinación de la proporción de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64K, y la definición del mapa peptídico que caracteriza a esta nueva composición de vacuna.

El ejemplo 2 describe los bioensayos realizados en ratones para evaluar la inmunogenicidad de las nuevas composiciones de vacunas descritas en la presente invención. El ejemplo 3 describe la eficacia en el uso clínico de la presente composición de vacuna para el tratamiento de tumores pulmonares de origen epitelial.

45 El ejemplo 4 describe la obtención de composiciones de vacunas ajustadas a diferentes potencias (miligramos totales del conjugado de hrEGF-rP64K/vial) empleando la misma metodología de conjugación y purificación descritas en la presente invención.

El ejemplo 5 muestra la eliminación del glutaraldehído utilizado en la reacción de conjugación mediante la metodología de purificación del conjugado químico a través de una membrana de ultrafiltración de 50 kDa.

Ejemplos

50 **Ejemplo 1: Caracterización molecular de la composición de vacuna descrita en la presente invención (composición de vacuna A)**

1.1 Caracterización cromatográfica de la composición de vacuna descrita en la presente invención

Para la caracterización cromatográfica de la composición de vacuna purificada mediante ultrafiltración, se emplearon conjugados homoligómeros de hrEGF-hrEGF y de rP64K-rP64K como indicadores.

5 Los perfiles cromatográficos mostrados por los conjugados homoligómeros (hrEGF-hrEGF y rP64K-rP64K) se compararon con el perfil cromatográfico mostrado por el conjugado sin purificar obtenido mediante la reacción de conjugación química entre las proteínas hrEGFy rP64K. En la figura 1 se muestran los perfiles de los conjugados homoligómeros rP64K-rP64K y el perfil obtenido cuando se realiza la conjugación química entre las proteínas hrEGFy rP64K (conjugado químico sin purificación mediante ultrafiltración). El área dentro del círculo pertenece a la especie conjugada de hrEGF-rP64K. El perfil del conjugado de rP64K-rP64K no muestra una coincidencia total con éste del conjugado químico de hrEGF-rP64K debido a la contribución de las moléculas de hrEGF conjugadas con el rP64K.

10 En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos después de realizar una electroforesis no naturalizada en condiciones reductoras y una transferencia Western de la composición de vacuna purificada mediante ultrafiltración. El revelado se realizó con un anticuerpo anti-EGF conjugado con fosfatasa alcalina. El EGF es una proteína con un peso molecular aparente de 6 kDa así que debería localizarse en el área inferior del gel. Su identificación mediante inmunodetección con anticuerpos anti-EGF en el área que corresponde a las proteínas con un peso molecular aparente superior a 6 kDa confirma que las moléculas de hrEGF existen junto con el rP64K en el área del gel que se corresponde con la especie conjugada de hrEGF-rP64K.

15 Cuando se compara el perfil cromatográfico del conjugado químico de hrEGF-rP64K sin purificación con el del conjugado homoligómero hrEGF-hrEGF, puede apreciarse que existe una correspondencia entre ambos perfiles. Esta prueba confirma que después del valle existe una zona que se corresponde con las especies de hrEGF conjugadas entre ellas (polímeros de EGF), así como con hrEGF libre (figura 3).

20 El perfil cromatográfico de exclusión molecular (figura 4) de la composición de vacuna objeto de la presente invención muestra que el área que se corresponde con la especie conjugada de hrEGF-rP64K constituye más del 90% del área total del cromatograma (área sombreada), lo cual prueba la alta homogeneidad de la composición de vacuna descrita.

25 1.2 Proporción de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64K en la composición de vacuna descrita en la presente invención

Con el objetivo de determinar la proporción de conjugación de hrEGF y rP64K en la composición de vacuna se determinaron los moles de cada una de las proteínas constitutivas. Para esto se tomó una composición de vacuna obtenida a partir del proceso de ultrafiltración de 50 kDa, y se recogió la fracción cromatográfica que se corresponde con la especie conjugada de hrEGF-rP64K. Estas fracciones se sometieron a un análisis de aminoácidos.

30 La determinación de la proporción de conjugación se realizó mediante dos métodos:

1. Un método se basa en el cálculo de la cantidad de fenilalanina (Phe) y treonina (Thr) en la composición de vacuna (aminoácidos presentes sólo en la molécula de rP64K). Las cantidades de estos aminoácidos se emplearon para determinar la cantidad de rP64K. Comenzando a partir de este último, y tomando en cuenta la cantidad total de aminoácidos de la mezcla, se determinó la cantidad de EGF.

35 2. El otro método se basa en la determinación directa de las cantidades relativas de cada proteína empleando la secuencia de aminoácidos y basándose en la cuantificación de los aminoácidos asparagina+ácido aspártico (Asx), glutamina+ácido glutámico (Glx), glicina (Gly) y alanina (Ala) (estos restos son muy estables frente a la hidrólisis ácida y se emplean habitualmente para la cuantificación de proteínas).

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos mediante cada método.

40 Tabla 1: Determinación de la proporción de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64K realizando la determinación de la composición de aminoácidos de la composición de vacuna purificada mediante ultrafiltración, basándose en el método de la determinación de la cantidad de fenilalanina (Phe) y treonina (Thr)

| Cantidad media de rP64K | Cantidad media de hrEGF | Proporción media de conjugación |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 12,07 nmoles | 23,13 nmoles | 1,92 |

45

Tabla 2: Determinación de la proporción de conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64K realizando la determinación de la composición de aminoácidos de la composición de vacuna purificada mediante ultrafiltración, basándose en el método de la determinación de las cantidades relativas de los aminoácidos asparagina+ácido aspártico (Asx), glutamina+ácido glutámico (Glx), glicina (Gly) y alanina (Ala)

| Proteína | Cantidad de proteína | Proporción de conjugación |
|----------|----------------------|---------------------------|
| rP64K | 12,04 nmoles | 2,00 |
| hrEGF | 24,05 nmoles | |

5 Los resultados obtenidos mediante ambos métodos muestran una correspondencia en el cálculo de la proporción de conjugación entre las proteínas hrEGF:rP64K para la composición de vacuna descrita en la presente invención. La proporción de conjugación calculada era de 1:2, lo cual significa 2 moléculas de hrEGF por cada molécula de rP64K.

1.3 Mapas peptídicos que caracterizan la composición de vacuna descrita en la presente invención

10 Con el objetivo de caracterizar la estructura de la composición de vacuna presentada en la presente invención y para probar la reproducibilidad del procedimiento, se desarrolló y se caracterizó el mapa peptídico obtenido después de la digestión de las fracciones del conjugado de hrEGF-rP64K con la endoproteasa Glu-C. Cada una de las fracciones del mapa obtenido se identificó y se secuenció mediante una espectrometría de masas. La figura 5 muestra los
 15 mapas peptídicos obtenidos comenzando a partir de dos composiciones de vacunas obtenidas independientemente, en los que se aprecia una gran similitud en los péptidos que aparecen y en su proporción relativa. La reproducibilidad entre estos mapas peptídicos obtenidos comenzando a partir de ambas composiciones de vacunas es una indicación del control que existe frente a las condiciones en las que se producen los procedimientos de conjugación química y purificación (descritos en la presente invención).

20 La identificación de los péptidos contenidos en cada fracción del mapa se obtuvo mediante el análisis de cada uno de ellos mediante el método MALDI (ionización/desorción mediante láser asistida por matriz) y mediante el método ESI-MS (ionización de electronebulización). En la tabla 3 se muestra la secuencia de los péptidos principales.

| Pico | Péptidos |
|------|---------------------------------|
| HG05 | LDID |
| | QAAPTGE |
| HG06 | SIGMAAE |
| | AEGTAAAPKAE |
| HG08 | AEGTAAAPKAE |
| HG09 | KISE |
| | SIGMAAE |
| HG11 | AAAAPAQEAPKAA |
| | GANAPKEPQRYD |
| HG12 | SIGMAAE |
| HG14 | VKVKVGDKISE |
| HG15 | VAWVGE |
| HG16 | VAWVGETE |
| | VSLTAGDAYE |
| HG17 | VCLAIE |
| HG18 | VRHLAANGIKYPEPE |
| HG19 | AAAAPAQEAPKAAAPAPQAAQFG |
| | VRHLAANGIKYPEPE |
| HG20 | LKVPDIGGHE |
| | RVIPGVAYTSPE |
| | TGRIIGGGIVGPN |
| | VRHLAANGIKYPEPE |
| HG21 | KAGVAVTDRGFIE |
| | LIFDAE |
| | GGPQGYSAAFAADE |
| HG22 | ARVIPGVAYTSPE |
| | GLKVAIVE |
| HG23 | AAAAPAQEAPKAAAPAPQAAQFGGSADAELY |
| | Ø |
| | MGCDAADIGKTIHPHPTLGE |
| | PKEPQRYDAVLVAAGR |
| HG24 | NVDIIAVE |
| | YDVVVLG |

| Pico | Péptidos |
|------|--|
| HG25 | AVLVAAGRAPNGKLISAE MGCDAAADIGKTIHPHPTLGE TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE |
| HG26 | TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE VRHLAANGIKYPEPELD |
| HG27 | TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE RCQYRDLKWE |
| HG28 | GGLIVVVE |
| HG29 | GGLIVVVE TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE YRFDNIMVNTKTVAVEPKED |
| HG30 | AIGDIVGQPMLAHKAVHE AIGDIVGQPMLAHKAVHE |
| HG31 | ALDKYACNCVVG YIGE ALDKYACNCVVG YIGE |
| HG32 | ARVIPGVAYTSPE LDIDMLRAY MDVPAEVAGVVKE |
| HG33 | TGRIIGGGIVGPNGGDMIGE ALDKYACNCVVG YIGE GYCLHDGVCMYIE RCQYRDLKWE |
| HG34 | NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE |
| HG35 | GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE |
| HG36 | GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE VIDEVRHLAANGIKYPE |
| HG37 | MGTVYSTLGSRLDVVE |
| HG38 | IIGGGIIGLE MDVPAEVAGVVKEVK NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE |
| HG39 | VVVLGGGPGGYSAAFAAADE |
| HG40 | MGTVYSTLGSRLDVVE |
| HG41 | LKVPDIGGHENVDIIAVE |

| Pico | Péptidos |
|------|--|
| HG42 | RCQYRDLKWWEL |
| HG43 | VDKQMRNTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE ASGRAIANGCDNGFTKLIFDAE |
| HG44 | VDKQMRNTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE |
| HG47 | YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE AIANGCDNGFTKLIFDAE |
| HG48 | RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAAVIDE |
| HG49 | VNVGDTIAVDDTLITLD RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAAVIDE YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE IVGQPMLAHKAVHEGHVAAENCAGHKAYFD NGFTKLIFDAETGRIIGGGIVGPNGGDMIGE |
| HG50 | TGRIIGGGIVGPNGGDMIGEVCLAIEMGCD |
| HG51 | RCQYRDLKWWEL |

Tabla 3: Composición de aminoácidos de los principales péptidos obtenidos después de la digestión de la fracción del conjugado de EGF-P64K con la endoproteasa Glu-C. La composición de aminoácidos se determinó mediante MALDI y ESI-MS.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de la composición de vacuna descrita en la presente invención

5 En este ejemplo se describe el ensayo de actividad biológica realizado para la evaluación de la inmunogenicidad de la composición de vacuna descrita previamente (composición de vacuna A), en comparación con una composición de vacuna descrita en el documento EP 0657175 (denominada composición de vacuna B).

10 Para el ensayo se inocularon 10 ratones con una dosis única de 200 μ l de una emulsión de agua en aceite (al 50%/50% en v/v) de los inmunógenos (composición de vacuna convencional obtenida mediante diálisis, composición de vacuna obtenida mediante una purificación con una membrana de ultrafiltración y permeado obtenido a partir de un proceso de purificación mediante UF/DF en la que la especie conjugada de hrEGF-hrEGF está presente), con el adyuvante MONTANIDE ISA 51. La dosis de proteína aplicada para cada inmunógeno se indica en la tabla 4.

15 En los 14 días después de la inoculación se realizó la extracción de suero de los animales y la evaluación de los títulos de anticuerpos anti-EGF mediante un ELISA. El criterio positivo para el ensayo fue que la densidad óptica medida a 405 nm debe ser mayor que el doble del valor medio obtenido para el blanco. El blanco se obtiene cuando se añade al pocillo un tampón de bloqueo en lugar de suero. Se aplicó el ensayo de Mann-Whitney al análisis de los datos utilizando un programa estadístico.

Tabla 4: Inmunógenos evaluados y concentraciones de proteínas que se van a inocular por animal según el correspondiente ensayo de actividad biológica

| Inmunógenos | Concentración de proteínas (Lowry) |
|--|------------------------------------|
| Composición de vacuna A | 1,5 mg/ml |
| Composición de vacuna B | 1,5 mg/ml |
| Conjugados homopolímeros de hrEGF y hrEGF libre obtenidos a partir de la purificación mediante UF/DF de la composición de vacuna A | 0,6 mg/ml |

20 En la figura 6, los resultados del ensayo de actividad biológica se muestran como pruebas de la actividad inmunogénica de cada inmunógeno evaluado. Los componentes del inmunógeno que se corresponden con los conjugados de hrEGF homopolímeros y el hrEGF libre no muestran una actividad biológica importante, porque su respuesta es a nivel de los criterios positivos para el ensayo o inferiores. Estos resultados verifican la hipótesis de

que el EGF por sí mismo no induce una respuesta inmunogénica.

5 El análisis estadístico de todos los resultados cuando se aplica el ensayo de Mann-Whitney (tabla 5) muestra unas diferencias muy significativas para los títulos de anticuerpos anti-hrEGF 1/1000 con $p = 0,0004$, y para el título 1/100 con $p = 0,0006$ para grupos de animales inoculados con la composición de vacuna A, comparado con los títulos alcanzados por el grupo de animales inoculados con la composición de vacuna B. Esto indica que la composición de vacuna A, purificada por medio de una membrana de ultrafiltración, tiene mayor actividad inmunogénica por miligramo de proteína que la composición de vacuna B, obtenida mediante el método de purificación basado en una membrana de diálisis.

10 La composición de vacuna A produce un incremento de las concentraciones de anticuerpos anti-EGF (a una dilución 1/1000) 10 veces mayor, comparado con el alcanzado cuando se inmuniza con los conjugados que corresponden al hrEGF polimérico y al hrEGF libre.

Cuando se compara con la composición de vacuna previamente descrita en el documento EP 0657175, la composición de vacuna descrita en la presente invención produce un incremento en dos veces de la concentración de anticuerpos anti-hrEGF.

15 Tabla 5: Informe estadístico - ensayo de Mann-Whitney utilizado para evaluar la inmunogenicidad de ambas composiciones de vacunas a través de los títulos de anticuerpos anti-hrEGF en ratones

| | | | |
|--|--------|----------|----------------|
| Análisis estadístico de los títulos de anticuerpos anti-hrEGF en ratones (dilución 1/1000) | | | |
| Ensayo de Mann-Whitney y CI: G1 1/1000; G3 1/1000 | | | |
| | | N | Mediana |
| G1 (Composición de vacuna A) | 1/1000 | 20 | 0,4300 |
| G3 (Composición de vacuna B) | 1/1000 | 20 | 0,7120 |
| El cálculo puntual para ETA1-ETA2 es -0,3115. | | | |
| El 95,0% de CI para ETA1-ETA2 es (-0,4500; -0,1790). | | | |
| W = 278,0 | | | |
| Ensayo de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 sin = ETA2 es significativo a 0,0004. | | | |
| El ensayo es significativo a 0,0004 (ajustado para empates) | | | |
| Análisis estadístico de los títulos de anticuerpos anti-hrEGF en ratones (dilución 1/100) | | | |
| Ensayo de Mann-Whitney y CI: G1 1/100; G3 1/100 | | | |
| | | N | Mediana |
| G1 (Composición de vacuna convencional) | 1/100 | 20 | 1,0785 |
| G3 (Composición de vacuna por ultrafiltración) | 1/100 | 20 | 1,3040 |
| El cálculo puntual para ETA1-ETA2 es -0,2590. | | | |
| El 95,0% de CI para ETA1-ETA2 es (-0,4389; -0,1149). | | | |
| W = 282,5 | | | |
| Ensayo de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 sin = ETA2 es significativo a 0,0006. | | | |
| El ensayo es significativo a 0,0006 (ajustado para empates) | | | |

Ejemplo 3: Evaluación de la eficacia clínica de la composición de vacuna descrita en la presente invención para el tratamiento de tumores pulmonares de origen epitelial

20 El objetivo de este ejemplo es evaluar en pacientes la inmunogenicidad provocada por la composición de vacuna A en comparación con la inmunogenicidad inducida por la composición de vacuna B obtenida mediante el método de purificación mediante diálisis.

En este estudio se trataron pacientes con etapas avanzadas de tumores del cáncer de pulmón de células no

microcíticas (NSCLC). Se definieron dos grupos de pacientes (pacientes vacunados con la preparación B y pacientes vacunados con la preparación A descrita en la presente invención). La dosis de la composición de vacuna por paciente en cada grupo fue la siguiente: los pacientes vacunados con la preparación B recibieron 1,2 mg de proteínas totales por sitio de inmunización, mientras que los pacientes vacunados con la preparación B recibieron 0,6 mg de proteínas totales por sitio de inmunización. Para ambos grupos, los sitios de inmunización fueron 4. Todos los pacientes recibieron terapia oncoespecífica al menos 4 semanas antes de comenzar el ensayo. Las inmunizaciones se realizaron por la vía intramuscular y se continuaron produciendo cada mes.

Se evaluó la respuesta inmunológica humoral de ambos grupos de pacientes a través de su suero. La variable principal para evaluar los resultados es el título de anticuerpos anti-EGF específicos. Este parámetro se determina mediante un ELISA. Los valores positivos son los que producen unas lecturas de densidad óptica 2 veces mayores que el control negativo. El título de anticuerpos indicado es la dilución máxima del suero positivo.

El análisis de la respuesta inmunológica de los pacientes en cada grupo, según se representa en la tabla 6, demuestra que la media geométrica del título máximo de anticuerpos en el grupo de pacientes tratados con la preparación A se corresponde con 1:56421, mientras que en el grupo de pacientes inmunizados con la preparación B era de 1:23515. Esto significa que la composición de vacuna descrita en la presente invención provoca un aumento en dos veces de la media geométrica del título máximo de anticuerpos, comparado con los títulos alcanzados con la preparación B.

Históricamente, los pacientes no inmunizados muestran un título de anticuerpos anti-EGF autólogo de 1:500. Por tanto, la composición de vacuna descrita en la presente invención (composición de vacuna A) provoca un aumento en al menos 100 veces del título de anticuerpos anti-EGF en pacientes no inmunizados.

Tabla 6: Resultado del análisis de la media geométrica de la inmunogenicidad para ambas composiciones de vacunas a través de la medición de los títulos de anticuerpos anti-EGF en el suero de pacientes

| | Total de pacientes | Media geométrica |
|-------------------------|--------------------|------------------|
| Composición de vacuna A | 11 | 56421 |
| Composición de vacuna B | 9 | 23515 |

Es importante subrayar que el grupo de pacientes inmunizados con la composición de vacuna A, descrita en la presente invención, mostró una media geométrica mayor de los títulos de anticuerpos anti-EGF recibiendo la mitad de la cantidad de proteínas totales por inmunización (2,4 mg) que la recibida por el grupo de pacientes inmunizados con la composición de vacuna B (4,8 mg de proteínas totales), lo cual constituye un resultado sorprendente. Estos resultados prueban que el exceso de proteína autóloga hrEGF, tanto en forma de polímeros como libre, no contribuye a que la composición de vacuna sea más inmunogénica, sino que diluye la acción inmunológica del conjugado químico de hrEGF-rP64K.

Ejemplo 4: Obtención de la composición de vacuna ajustada a diferentes potencias (concentración de proteínas totales por vial)

Con el fin de demostrar la capacidad de obtener composiciones de vacunas con diferentes potencias (concentraciones de proteínas totales por vial) se puso en práctica la metodología de purificación como se describe a continuación:

Ensayo 1: Cuando finaliza la diafiltración, el conjugado químico purificado se concentra hasta una concentración de proteínas final de 2 mg/ml.

Ensayo 2: Cuando finaliza la diafiltración, el conjugado químico purificado se concentra hasta una concentración de proteínas final de 5 mg/ml.

Ensayo 3: Cuando finaliza la diafiltración, el conjugado químico purificado se concentra hasta una concentración de proteínas final de 12 mg/ml.

En todos los ensayos el volumen total de conjugados químicos empleados era de 1500 ml, se realizaron a una presión transmembrana de 1,5 bar, y se realizaron 7 cambios de disolución tampón durante la diafiltración. Para realizar esta evaluación se establecieron dos criterios de selección.

El primero consistía en alcanzar un porcentaje de homogeneidad de la composición de vacuna > 80%.

El segundo criterio consistía en la no presencia de proteínas precipitadas durante la operación de purificación.

Los resultados, presentados en la tabla 7, demuestran que las composiciones de vacunas ajustadas a diferentes concentraciones de proteínas por ml garantizan unos altos niveles de homogeneidad (90,92%, 96,79%, y 95,05% de especies conjugadas de hrEGF-rP64K) y sin producir la precipitación de las proteínas.

Tabla 7: Valores correspondientes al porcentaje de homogeneidad en las composiciones de vacunas ajustadas a diferentes concentraciones de proteínas finales

| Concentración de proteínas | % de homogeneidad de la composición de vacuna |
|----------------------------|---|
| 2 mg/ml | 92,00% |
| 5 mg/ml | 96,79% |
| 12 mg/ml | 95,50% |

Ejemplo 5: Eliminación del glutaraldehído de la composición de vacuna de la presente invención

5 Para evaluar la eliminación del agente de conjugación (glutaraldehído) se cuantificó el contenido en glutaraldehído residual en la composición de vacuna B y en la composición de vacuna A mediante un método de separación cromatográfica en fase inversa (HPLC-RP) empleando una columna C-8.

Este método requiere, en primer lugar, la precipitación de las proteínas contenidas en las muestras con ácido perclórico y una posterior reacción con fenilhidrazina.

10 La figura 7 demuestra que el contenido residual de esta impureza en ambas composiciones de vacunas era menor que 0,2 ug/ml o menor que 0,002 ppm (límite superior de concentración establecido para esta impureza) a partir de una concentración inicial de 530 mg/ml o 530 ppm. Incluso cuando ambas preparaciones satisfacen el requisito establecido para esta impureza, la figura 7 indica que la composición de vacuna A (obtenida aplicando el método de ultrafiltración para la purificación del conjugado químico) posee un menor contenido en glutaraldehído, lo cual contribuye a una mayor seguridad para el paciente que utilice esta composición de vacuna.

15 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Muestra el solapamiento del cromatograma de un conjugado homoligómero de rP64K-rP64K con el cromatograma de un conjugado químico de EGF-P64K no purificado. Dentro del círculo se muestra la coincidencia de los perfiles entre ambos cromatogramas. El eje de abscisas representa el tiempo hasta la elución de cada componente de la muestra, y el eje de ordenadas representa el valor de la intensidad a 216 nm para cada componente de la muestra, como indicador de la concentración de proteínas.

Figura 2: Inmunodetección con un anticuerpo anti-EGF conjugado con fosfatasa alcalina, después de una separación electroforética de SDS-PAGE para la composición de vacuna obtenida mediante la ultrafiltración. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: composición de vacuna.

25 Figura 3: Muestra el solapamiento del cromatograma correspondiente al conjugado homoligómero de hrEGF-hrEGF y del cromatograma correspondiente al conjugado químico de EGF-P64K sin purificar. Dentro del círculo se muestra la coincidencia de especies entre ambos cromatogramas. El eje de abscisas representa el tiempo hasta la elución de cada componente, y el eje de ordenadas representa el valor de la intensidad a 216 nm para cada componente de la muestra, como indicador de la concentración de proteínas.

30 Figura 4: Perfil cromatográfico correspondiente a la vacuna descrita en la presente invención. El área sombreada corresponde a la especie de conjugado de hrEGF-rP64K. El eje de abscisas representa el tiempo hasta la elución de cada fracción, y el eje de ordenadas representa el valor de la intensidad a 216 nm para cada componente de la muestra, como indicador de la concentración de proteínas.

35 Figura 5: El mapa peptídico de la fracción cromatográfica que corresponde al conjugado de hrEGF-rP64K. Estos son los resultados de dos composiciones de vacunas purificadas independientemente mediante una membrana de ultrafiltración. El eje de abscisas representa el tiempo, y el eje de ordenadas representa las unidades de mili-intensidad.

40 Figura 6: Títulos de anticuerpos anti-hrEGF en ratones inmunizados con diferentes inmunógenos: la composición de vacuna convencional, la composición de vacuna purificada mediante ultrafiltración y permeado procedente de un método de purificación mediante ultrafiltración. El eje de abscisas corresponde a las diluciones del suero de cada animal, y el eje de ordenadas representa el valor de la densidad óptica a 405 nm de cada muestra, como indicador de la concentración de proteínas.

45 Figura 7: Perfil cromatográfico mediante HPLC-RP obtenido durante la cuantificación del contenido en glutaraldehído residual de la composición de vacuna obtenida mediante el método de purificación que emplea membranas de ultrafiltración de 50 kDa (composición de vacuna A) y para la composición de vacuna obtenida utilizando el método de purificación por diálisis (composición de vacuna B).

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición de vacuna que comprende, como principio activo, el conjugado de proteínas hrEGF-rP64K, en la que cada molécula de proteína P64K está unida a dos moléculas de hrEGF, y en la que la composición de vacuna comprende al menos 90% del principio activo.
- 5 2.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que la proporción de conjugación entre la proteína portadora rP64K y el hrEGF es de 12,04:24,05 nmolar.
- 3.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que dicha composición es una mezcla homogénea del conjugado de hrEGF-rP64K que está exenta de otras especies moleculares, tales como polímeros de hrEGF o hrEGF libre.
- 10 4.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que la mezcla homogénea del conjugado de hrEGF-rP64K está exenta de glutaraldehído.
- 5.- La composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que la mezcla homogénea del conjugado de hrEGF-rP64K contiene además un adyuvante apropiado, seleccionado del grupo que consiste en hidróxido de aluminio o Montanide.
- 15 6.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que la mezcla homogénea del conjugado de hrEGF-rP64K es capaz de inducir un aumento en al menos 10 veces de los títulos de anticuerpos anti-EGF en el suero de animales inmunizados.
- 7.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que la mezcla homogénea del conjugado de hrEGF-rP64K es capaz de inducir un aumento en al menos 10 veces de los títulos de anticuerpos anti-EGF en el suero de seres humanos.
- 20 8.- La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que la mezcla homogénea del conjugado de hrEGF-rP64K es capaz de inducir un aumento en al menos 100 veces de los títulos de anticuerpos anti-EGF en el suero de seres humanos.
- 25 9.- Un procedimiento para obtener la composición de vacuna de la reivindicación 1 bajo estándares sanitarios, en el que dicho procedimiento comprende condiciones apropiadas para la conjugación covalente del EGF a la proteína portadora rP64K, y la purificación del complejo molecular, mediante la utilización de una membrana de ultrafiltración, para eliminar las especies conjugadas biológicamente inactivas y otras impurezas químicas.
- 30 10.- El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la reacción de conjugación consiste en una única etapa que comienza mezclando la proteína hrEGF previamente concentrada (> 6 mg/ml) y la proteína P64K (≥ 1 mg/ml) en el reactor de conjugación, y después añadiendo a la mezcla una disolución de PBS/MgCl₂ (pH 6,8-7,2) y la disolución de conjugación de glutaraldehído al 0,5%, e incubando dicha mezcla a $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación continua durante dos horas.
- 35 11.- El procedimiento de la reivindicación 10, en el que los parámetros de la conjugación entre las proteínas hrEGF y rP64K ajustan la proporción de conjugación a dos moléculas de hrEGF por cada molécula de rP64K.
- 40 12.- El procedimiento para obtener la composición de vacuna según la reivindicación 9, en el que la proteína conjugada se purifica mediante un método de ultrafiltración/diafiltración utilizando una membrana que tiene un tamaño de poro entre 50 y 100 kDa.
- 13.- El procedimiento para obtener la composición de vacuna según la reivindicación 12, en el que la proteína conjugada se purifica mediante un método de ultrafiltración/diafiltración utilizando una membrana que tiene un tamaño de poro de 50 kDa o 100 kDa.
- 45 14.- La composición de vacuna según la reivindicación 1 que comprende, como principio activo, el conjugado de proteínas hrEGF-rP64K, en la que dicha composición de vacuna se purifica mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9-13.
- 15.- La composición de vacuna según la reivindicación 1 que comprende, como principio activo, el conjugado de proteínas hrEGF-rP64K, en la que la concentración final de las proteínas totales está en el intervalo de 1-12 mg/ml.
- 16.- La composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 14 o 15, para su uso para el tratamiento de tumores epiteliales.

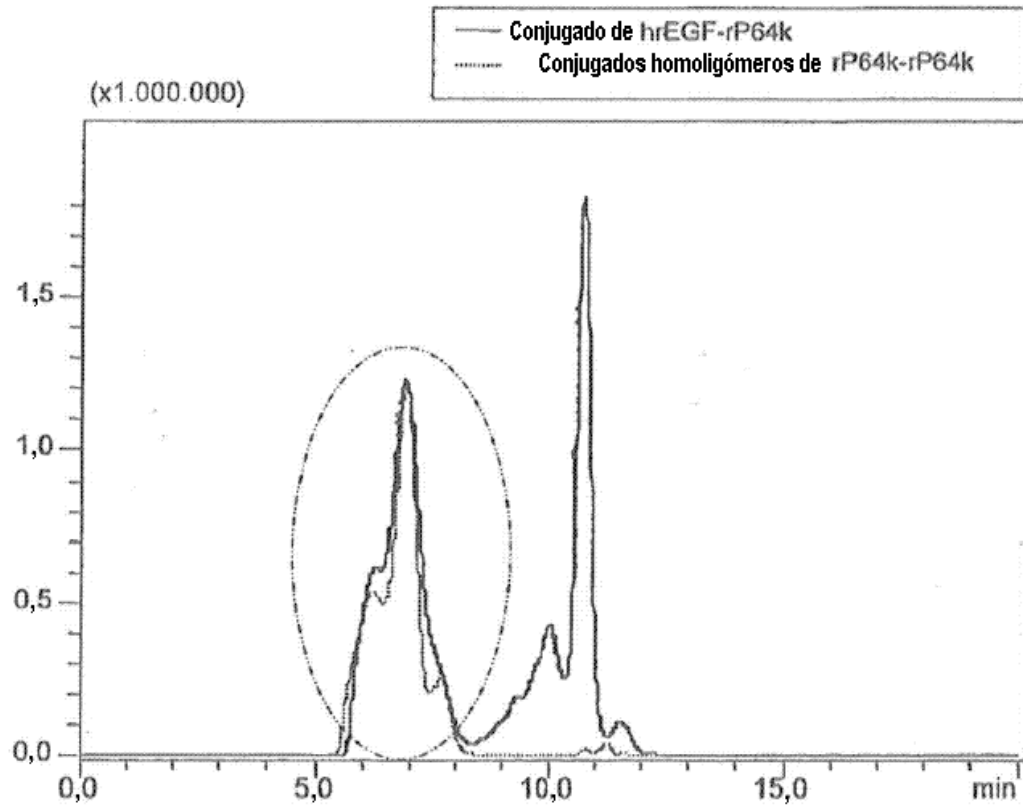


Fig. 1

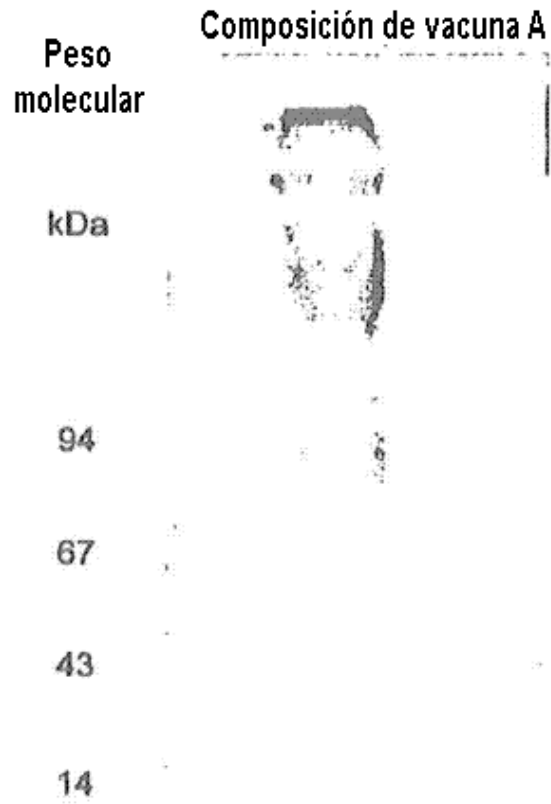


Fig. 2

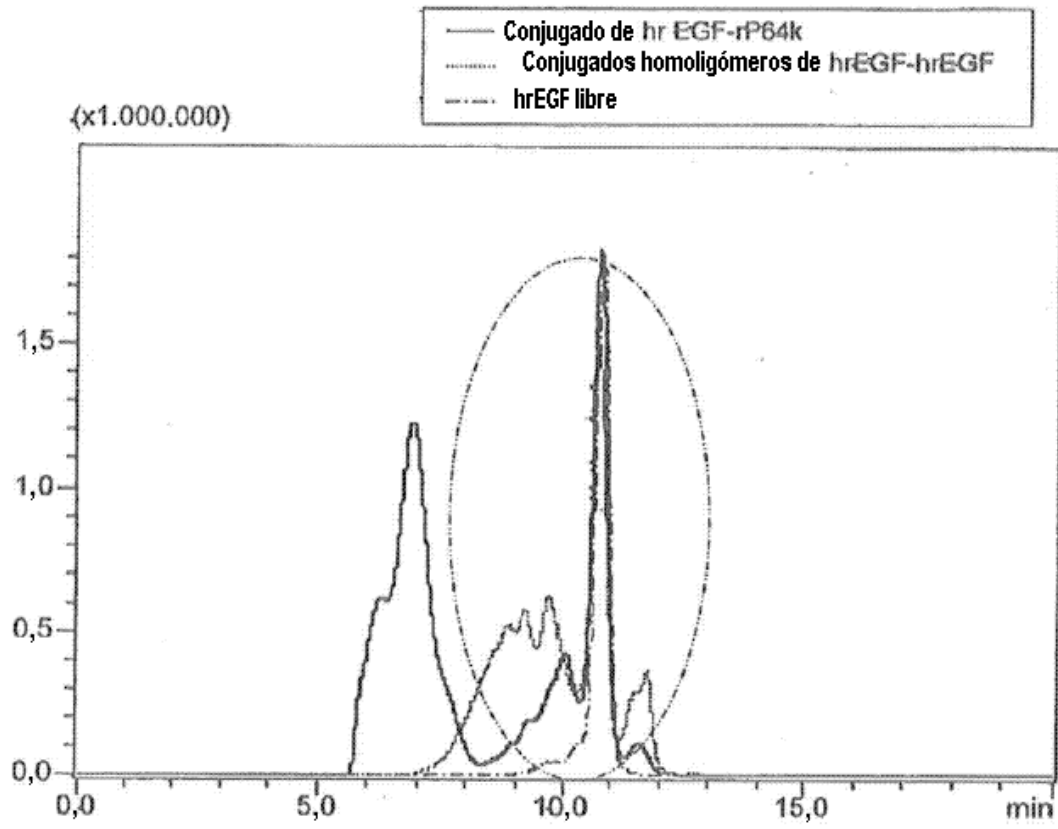


Fig. 3

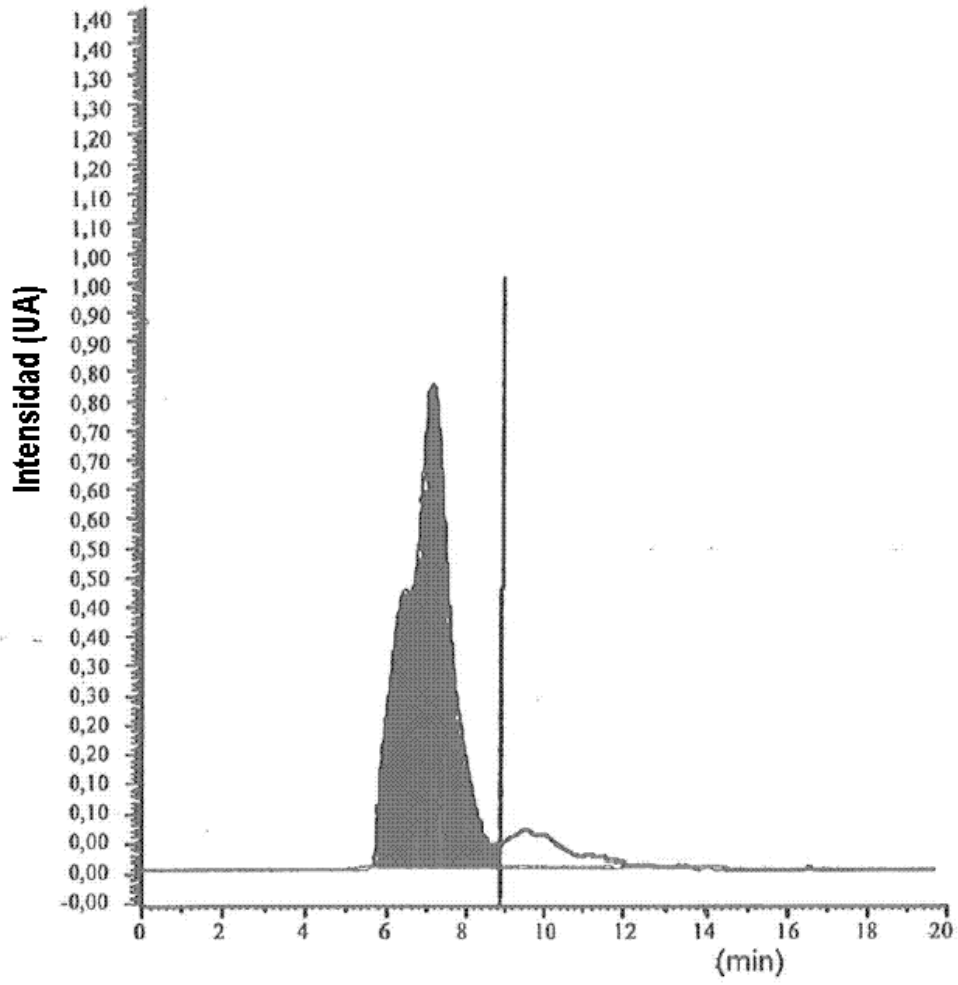


Fig. 4

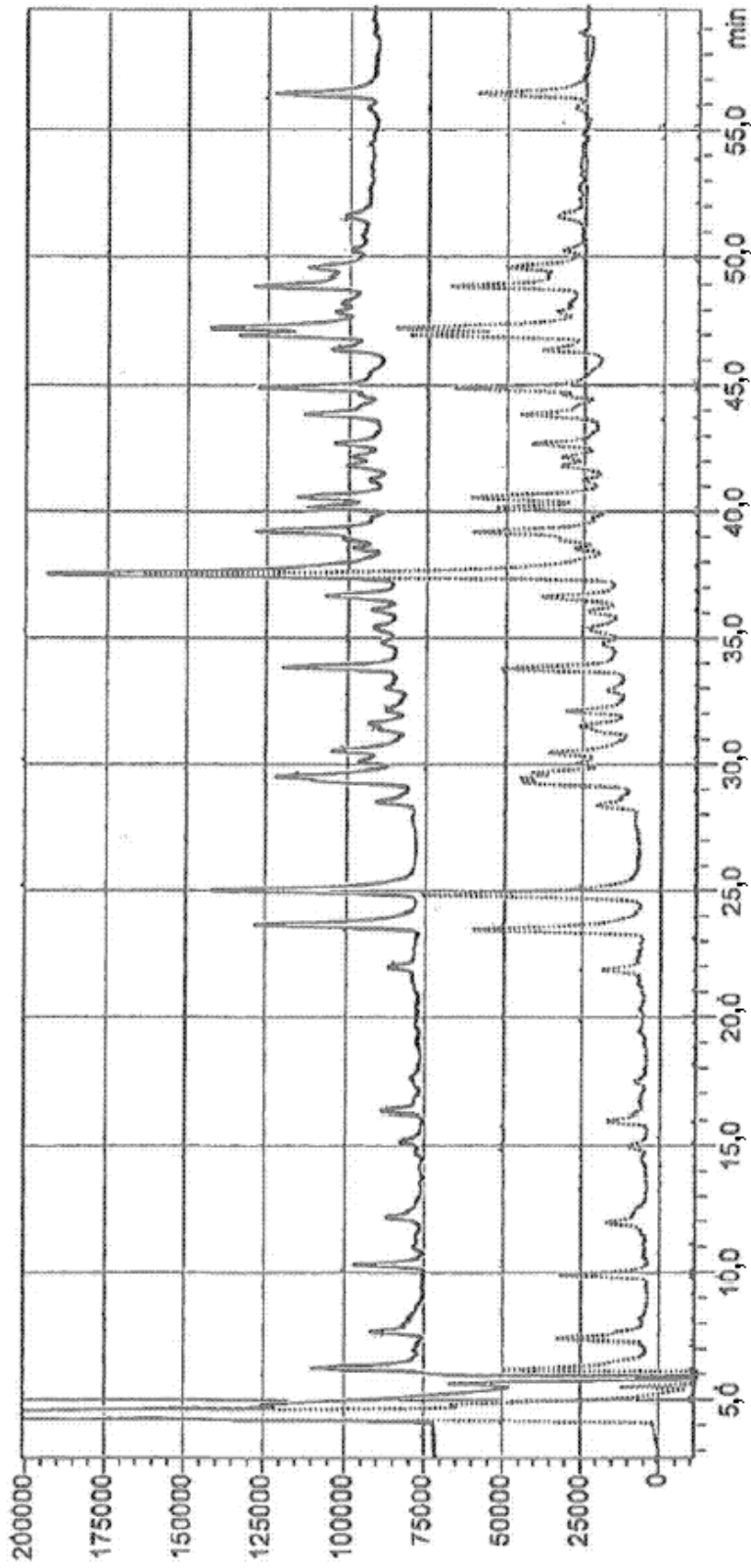


Fig. 5

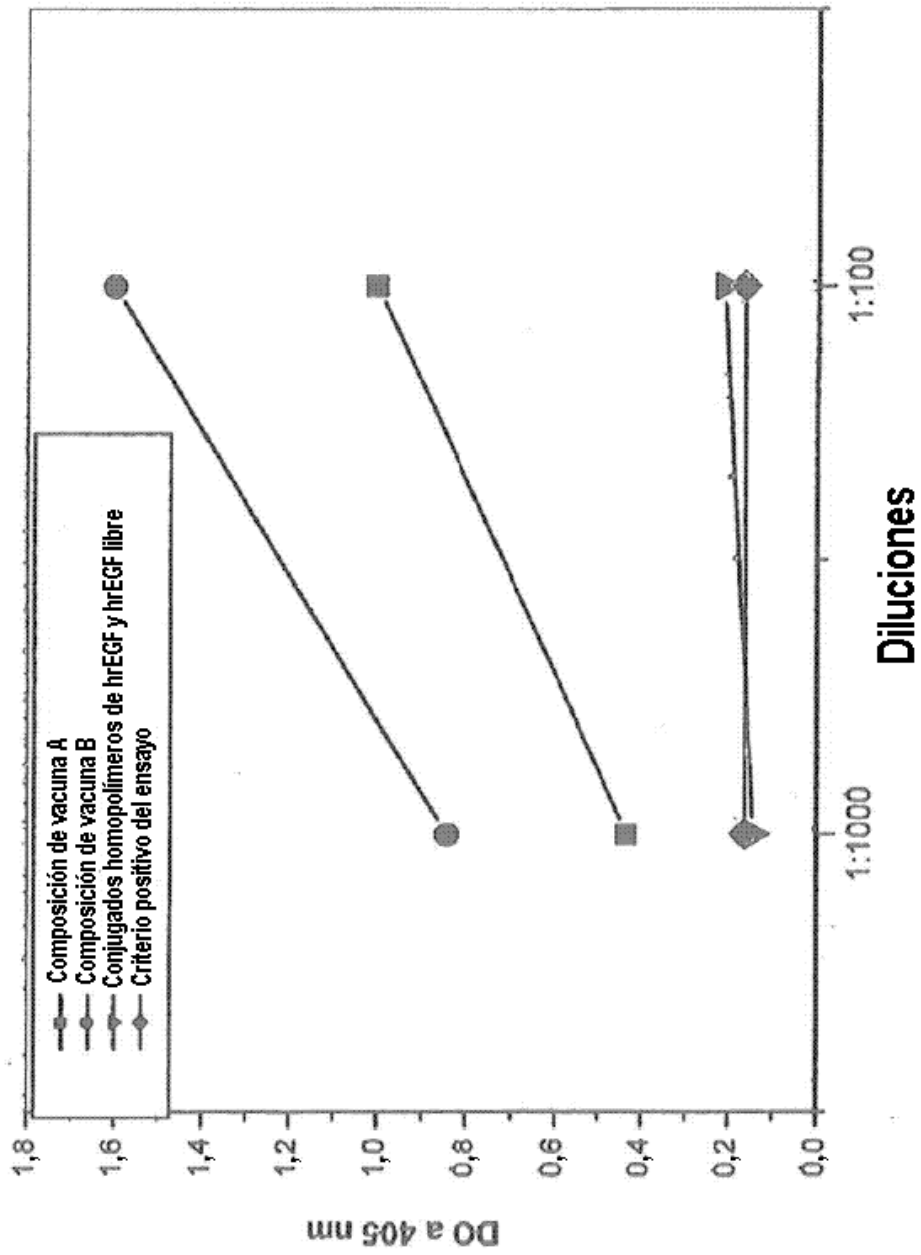


Fig. 6

Curva patrón: Glutaraldehído 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 mg/ml

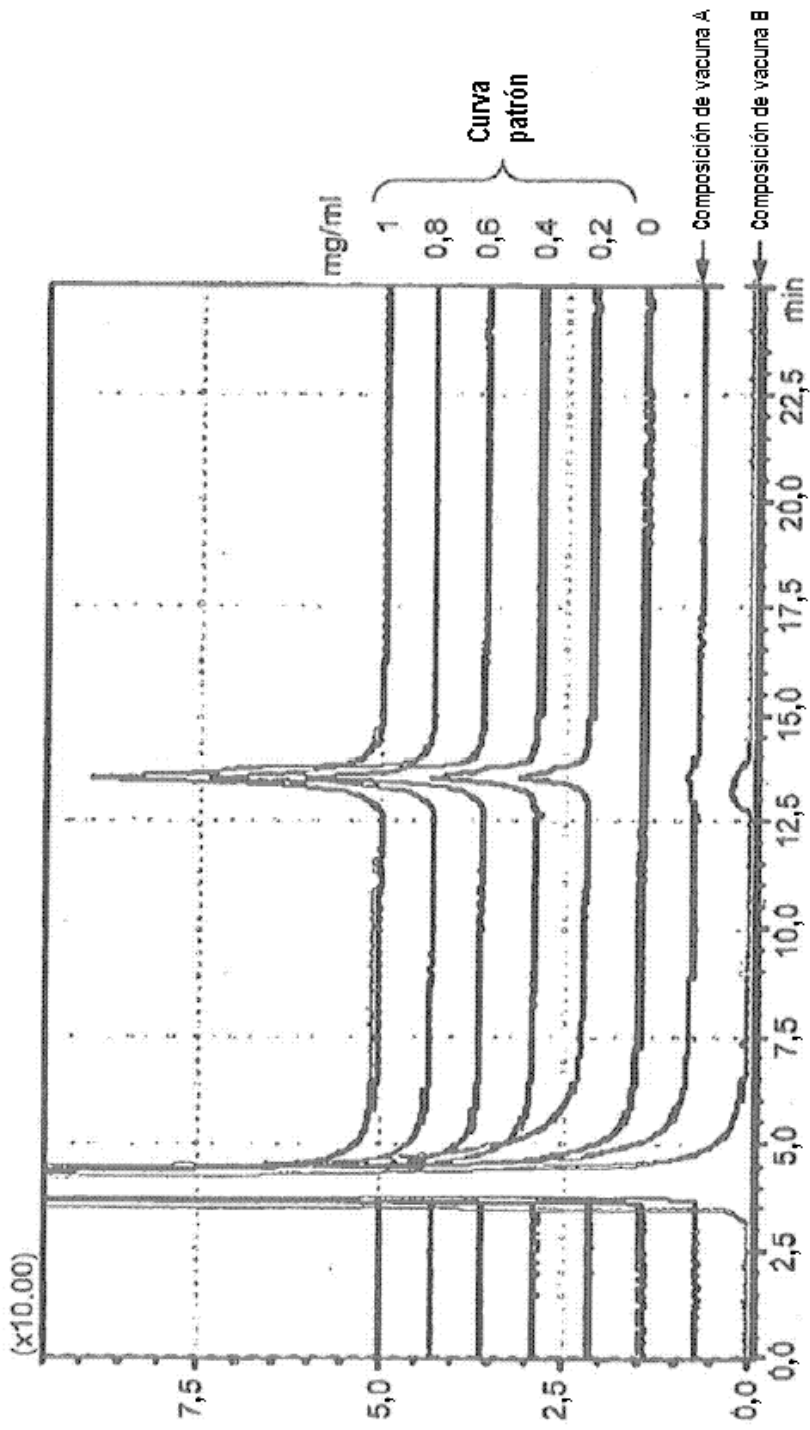


Fig. 7