

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 168**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/18** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2006 E 06763147 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **13.02.2008 EP 1885337**

54 Título: **Medicamento principalmente anti-canceroso, destinado a los tratamientos por inmunoterapia, en particular autólogos**

30 Prioridad:

**13.05.2005 FR 0551262**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.01.2013**

73 Titular/es:

**URODELIA (50.0%)  
LIEU DIT "LE GAILLARD" ROUTE DE SAINT  
THOMAS  
31470 SAINT LYS, FR y  
CIOCCA, DANIEL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRAYSSINET, PATRICK;  
ROUQUET, NICOLE y  
CIOCCA, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 394 168 T3

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).

## DESCRIPCIÓN

Medicamento principalmente anti-canceroso, destinado a los tratamientos por inmunoterapia, en particular autólogos.

### Campo de aplicación:

- 5 El dominio de la invención es el de los tratamientos por inmunoterapia, en particular los tratamientos de cánceres, de enfermedades infecciosas o de enfermedades auto-inmunes y de los medios asociados a éstos.

Más precisamente, la invención se refiere a los tratamientos autólogos por inmunoestimulación.

Más precisamente aún, la invención se refiere a medios de lucha principalmente contra el cáncer, que comprenden vacunas anti-tumorales obtenidas a partir de antígenos tumorales de los pacientes.

- 10 La presente invención pretende principalmente un medicamento, por ejemplo una vacuna antitumoral, a base de micropartículas minerales (por ejemplo, hidroxipatito) o poliméricas, biocompatibles.

La invención se refiere igualmente a un procedimiento de preparación de antígenos tumorales destinado a ponerlos en una forma reconocible por el sistema inmunitario y más particularmente para purificar los antígenos tumorales de un paciente determinado con el fin de realizar una autovacunación que genera una respuesta inmunitaria específica contra las células tumorales del paciente.

15

### Estado de la técnica:

Las formas de tratamiento contra el cáncer por inmunoterapia son actualmente de tres tipos:

I.- *Administración de sustancias farmacológicas que aumentan la respuesta inmunitaria de manera no específica.*

- 20 Puede tratarse por ejemplo de la administración de interleuquinas o de interferón a los pacientes que tienen un tumor maligno renal o bien un melanoma. Otra terapia no específica es la administración de BCG a los pacientes que tienen un cáncer de vejiga. Estas terapias tienen un grado variable de toxicidad y aunque puedan mostrar una determinada eficacia, muchos de los pacientes así tratados responden débilmente. Estas terapias provocan una amplificación de numerosas funciones inmunitarias.

II.- *Utilización de anticuerpos específicos contra los antígenos tumorales presentes en la superficie de las células tumorales.*

- 25 Uno de los ejemplos es la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la oncoproteína HER-2/neu. Esta oncoproteína se expresa en un porcentaje bajo (20-30%) de los pacientes que tienen un cáncer de mama. El anticuerpo monoclonal se ha modificado por ingeniería genética para que solamente una pequeña parte de la molécula sea de origen no humano (la parte que reconoce el antígeno es producida por la rata), el resto de la molécula es de origen humano. De hecho, es un anticuerpo híbrido humanizado. Se han preparado diversos anticuerpos híbridos que se han evaluado y algunos de ellos se utilizan clínicamente en el tratamiento de diversos tipos de tumores malignos. La unión de los anticuerpos a su antígeno específico lleva a la célula tumoral a ralentizar su proliferación y a la muerte. Aunque estos tratamientos sean un avance significativo, su eficacia está limitada por la variabilidad antigénica de las células tumorales. En un tumor sólido, en el momento del diagnóstico, existen millones de células tumorales y entre esta población, existen determinadas células que expresan los antígenos de interés y otras que no.

30

35

III.- *Estimulación de las células T.* Esta forma de terapia está relacionada con el objeto de la invención.

El tipo III comprende la inmunoterapia adoptiva, denominada así porque es adoptada por el paciente. No es innata, se desarrolla lejos del paciente (*ex vivo*), con el objetivo de aumentar el número de células T antitumorales. Esto se obtiene administrando al paciente células T citotóxicas que se han generado y amplificado *in vitro*.

- 40 El tipo III engloba igualmente la inmunoterapia activa basada en la estimulación de las células T. Esto se produce gracias a la puesta en contacto de los antígenos tumorales con los macrófagos o células emparentadas (como por ejemplo las células dendríticas de la piel: las células de Langerhans), que presentan los antígenos con el fin de que estas células denominadas APC (Antigen Presenting Cells: células presentadoras del antígeno) estimulen los linfocitos T. Esta estrategia puede hacerse *in vivo* o *in vitro*. Estas células APC inician, más que mantienen la inmunidad antitumoral específica obtenida de los linfocitos T. La inmunoterapia activa es el objeto de numerosas investigaciones para diversos tumores.

45

Estos agentes que estimulan los linfocitos T son asimilables a las vacunas. Así, existen varias estrategias A/, B/, C/, D/ para generar vacunas que estimulan el sistema T de forma activa y específica:

- 50 A/ Estrategia de inmunoterapia que se basa en el empleo de células dendríticas y otras células (*in vitro*). Cuando éstas están en fase de crecimiento, se ponen en contacto, fuera del organismo, con los antígenos tumorales del paciente (lisado tumoral autólogo, células tumorales irradiadas, péptidos tumorales específicos) y se inyectan intradérmicamente al mismo paciente (el resto se crioconserva para otras inyecciones).

5 B/ Estrategia de inmunoterapia que se basa en el empleo de antígenos específicos y de moléculas estimulantes. Los antígenos tumorales específicos que pueden utilizarse en las vacunas son numerosos, por ejemplo péptidos producidos de genes mutados como ras, p53, VHL, que están asociados con adyuvantes tales como Montanida ISA 51. Se pueden utilizar igualmente péptidos sintéticos o recombinantes solubles de fracciones de antígenos tumorales específicos como MART-1 (melanomas) o PSA (próstata).

C/ Estrategia de inmunoterapia que se basa en el empleo de células tumorales o de un lisado de células tumorales. Las células tumorales utilizadas en esta estrategia pueden ser células autólogas o alogénicas inactivadas de diversas maneras (radiación, congelación, calor, luz ultravioleta) o bien lisados de células tumorales (las células se homogeneizan).

10 D/ Estrategia de inmunoterapia que se basa en el empleo de proteínas de choque térmico como adyuvante:

En este caso, se extraen del tumor las proteínas de choque térmico (HSP) como gp 96 o HSP 70. Estas proteínas actúan como chaperones moleculares, y transportan péptidos (antígenos) específicos del tumor de cada paciente.

La capacidad de las HSP de unirse a casi todo el proteoma celular hace que estas moléculas sean una buena opción como vacunación antitumoral por tres razones principales:

- 15 • No es útil conocer todo el proteoma tumoral porque la purificación sólo de las HSP permite aislar un gran número de proteínas que están unidas a ellas
- Su inyección permite de una sola vez la introducción en el organismo de una gran cantidad de proteínas tumorales en una forma reconocible por el sistema inmunitario.
- 20 • Las HSP permiten la captación, el tránsito y el remodelado de las proteínas que están asociadas a ellas por las células presentadoras del antígeno con el fin de ser presentarlas a los linfocitos T.

Una de las características de la utilización de estas proteínas como vacuna antitumoral es la necesidad de utilizar las HSP que provienen del tumor a erradicar porque éstas constituyen una huella molecular de éste y es diferente entre pacientes y de un tumor a otro.

25 Esto impone purificar las proteínas vacunantes a partir de cada tumor contra el que éstas deben inmunizar al paciente. El protocolo de purificación es largo, difícilmente industrializable y está sujeto a múltiples contaminaciones por endotoxinas. Es clásico purificar las HSP a partir de un triturado tumoral que se somete a una serie de centrifugación, precipitación, cromatografía en Con A, análisis electroforético y cromatografía en Mono Q FPLC.

30 Las patentes US Nos 6.447.781, 6.436.404, 6.410.028, 6.383.494 y 6.030.618 describen métodos de purificación de proteínas HSP que consisten en aplicar columnas cromatográficas de Con A SEFAROSA. Estos métodos son perfectibles.

35 Por otra parte, se conocen métodos de purificación que recurren a los fosfatos de calcio y en particular al hidroxipatito (HA). Los polvos de hidroxipatito se utilizan desde hace treinta años para purificar diversas moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas e incluso virus. Los polvos se utilizan como lecho fijo en las columnas de cromatografía a través de las cuales se percola la disolución que contiene la o las moléculas a purificar. Estas moléculas se fijan en la superficie de las partículas de polvo, de la que se desadsorben mediante concentraciones de diversas disoluciones salinas tales como tampones fosfato o bien cloruro de sodio, lo que permite separar las diferentes moléculas de la disolución por gradientes de tampones fosfato u otros.

40 Las cerámicas de HA en forma porosa se utilizan igualmente desde hace veinte años como sustituto óseo. Se integran en el tejido óseo según una secuencia de eventos biológicos que se suceden y que pueden enumerarse como sigue:

- Invasión de los poros por las células circulantes
- Colonización por un tejido conjuntivo laxo.
- Formación del tejido osteoide en la superficie del material y mineralización
- Remodelado del hueso formado y degradación de las cerámicas.

45 La solicitud de patente US 2003/0082232 describe la utilización de soporte a base de fosfato de calcio y principalmente de hidroxipatito como adyuvante y vector para las vacunas eventualmente en combinación con un agente activo, siendo este agente activo un compuesto que ha experimentado un tratamiento de purificación. Entre los agentes activos citados, se indicarán las proteínas purificadas (por ejemplo: citoquina (GM-CSF o factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos), las toxinas diftérica y tetánica purificadas, la hemocianina de lapa), polvo, el virus humano desactivado VIH-2, un plásmido que expresa una proteína de *Plasmodium yoelii* (PyCSP), una bacteria (*Bordetella pertussis*) o también una vacuna. La adición del o de los agentes activos a la

preparación de adyuvante a base de fosfato de calcio se efectúa siempre con compuestos purificados, efectuándose dicha purificación mediante un protocolo que no aplica soporte a base de fosfato de calcio.

5 Uno de los objetivos esenciales de la invención es simplificar el procedimiento de preparación de antígenos tumorales destinado a ponerlos en una forma reconocible por el sistema inmunitario con el fin de poder aplicarlo a gran escala por un personal que no tiene una cualificación de bioquímico.

Para conseguir este objetivo, los inventores han tenido el mérito de desarrollar un procedimiento de preparación en una sola etapa a partir de triturado tumoral que permite disponer de una vacuna sobre un material vector. Este material permite a la vez, la purificación, la vectorización en el organismo y el transporte de las sustancias activas en las células diana: las células presentadoras de antígenos (APC).

10 Para conseguir este objetivo, los inventores han tenido el mérito de poner de manifiesto el interés de determinados soportes minerales en forma de micropartículas biocompatibles aptos para adsorber moléculas y/o materiales biológicos de interés con el objetivo de separar las moléculas y vectorizarlas.

15 Otro objetivo esencial de la invención es proponer un nuevo medicamento de inmunoterapia (por ejemplo autólogo) para el tratamiento de los cánceres, de las enfermedades infecciosas de las enfermedades auto-inmunes, entre otras.

De esta manera la invención se refiere a un procedimiento de preparación de antígenos tumorales destinado a ponerlos en una forma reconocible por el sistema inmunitario caracterizado por que consiste esencialmente en:

- aplicar un extracto tumoral,
- poner en contacto este extracto tumoral con un soporte mineral en forma de partículas apto para adsorber selectivamente los antígenos tumorales pretendidos y vectorizarlos *in vivo* a título de sustancias activas sobre el sistema inmunitario,
- hacerlo de manera que el soporte mineral en forma de partículas adsorba selectivamente los antígenos tumorales de interés,
- separar el soporte mineral del extracto tumoral no adsorbido de manera que se recojan los antígenos tumorales de interés en forma purificada y adsorbida sobre el soporte.

25 El procedimiento según la invención comprende ventajosamente una etapa adicional de mezcla de los antígenos tumorales purificados y adsorbidos en el soporte con al menos un cofactor apto para estimular la acción de los antígenos tumorales sobre el sistema inmunitario, obteniéndose dicho cofactor preferentemente de extractos tumorales, principalmente de triturados, liofilizados, dializados o sedimento de centrifugación.

30 El cofactor, en cuanto a él, proviene ventajosamente, al menos en parte, del extracto tumoral y más particularmente aún del extracto a partir del cual se han purificado los antígenos tumorales pretendidos por adsorción sobre el soporte mineral en forma de partículas. Este cofactor se elige aún más ventajosamente entre las citoquinas, interleuquinas, factor de crecimiento o interferón o sus mezclas.

35 Debe indicarse que los medios y el procedimiento según la invención permiten la eliminación de los factores tumorales que pueden conllevar efectos secundarios.

En una aplicación particular de la invención, el procedimiento de preparación de las proteínas tumorales comprende las etapas siguientes:

- preparación del extracto tumoral que permite la suspensión o la solubilización de los antígenos tumorales de interés,
- percolación de la suspensión o de la disolución a través de al menos una columna que contiene el soporte mineral en forma de partículas,
- lavado de la columna con disoluciones tampón de fuerza iónica y pH determinados,
- recogida del soporte que ha adsorbido los antígenos tumorales.

45 La etapa de lavado de la columna permite separar el soporte mineral del extracto tumoral no necesario para la inmunogenicidad. Se efectúa ventajosamente varias veces con tampones fosfato o disolución salina de concentración creciente. Así, el primer lavado se efectúa con un tampón fosfato o una disolución de NaCl de concentración inferior o igual a 200 mM mientras que un segundo lavado puede efectuarse con un tampón fosfato o una disolución de NaCl de concentración comprendida entre 300 a 500 mM.

En la práctica, la etapa de preparación del extracto tumoral se efectúa ventajosamente de la forma siguiente:

- eventualmente congelación del tejido tumoral,
- trituración del tejido tumoral,
- solubilización o suspensión de los antígenos tumorales citoplásmicos en una disolución de  $\text{NaHCO}_3$ ,
- centrifugación,
- 5 – separación del sedimento y del sobrenadante.

Siempre en la práctica, cuando el procedimiento de preparación de los antígenos tumorales aplica la etapa adicional de mezcla de los antígenos tumorales purificados y adsorbidos sobre el soporte mineral con micropartículas con un cofactor, dicho cofactor se prepara ventajosamente a partir del sedimento de centrifugación obtenido durante la preparación del extracto tumoral. Así, dicho sedimento se suspende, se somete a una etapa que pretende separar la fracción membranaria por centrifugación en un gradiente de azúcar, preferentemente sacarosa, recuperándose la fracción membranaria que comprende el cofactor así purificado.

El procedimiento según la invención se basa en la puesta de manifiesto por los inventores del interés de determinados soportes en forma de partículas. Así, el soporte mineral en forma de partículas según la invención tiene propiedades de superficie que permiten, incluido sin agente de acoplamiento, la fijación específica de sustancias activas, principalmente el agente biológico, y más particularmente antígenos tumorales y su transporte hacia las células del sistema de los fagocitos mononucleados. Para esto, el soporte mineral en forma de partículas se elige entre los minerales que presentan todas o parte de las propiedades siguientes: presencia de al menos uno de los grupos ionizados o ionizables  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$  y/o  $\text{CA}^{2+}$  en la superficie de dicho material, pH de superficie básico, potencial electrocinético negativo y/o hidrófobo. Dichos compuestos pueden elegirse en el grupo que comprende los minerales cálcicos, preferentemente los fosfatos de calcio y más preferentemente aún los hidroxiapatitos. El soporte mineral con micropartículas de elección que responde a las características citadas anteriormente se elige entre las cerámicas y principalmente una cerámica de fosfato de calcio, en particular un hidroxiapatito, un fosfato tri, tetra u octocálcico en forma de partículas.

Las cerámicas son un material de elección para la aplicación del procedimiento según la invención, en efecto, los fosfatos de calcio que han experimentado un tratamiento térmico calibrado están más adaptados para poner en contacto, y particularmente percolación de un triturado de tejidos que los fosfatos de calcio obtenidos directamente de la síntesis sin tratamiento. Los triturados de tejidos contienen principalmente fibrinas, las cuales son susceptibles de polimerizar en presencia de calcio y por lo tanto colmatar una columna que comprende dicho soporte.

Dicho soporte en determinadas condiciones de forma y de granulometría permite la percolación en una columna de un triturado tumoral sin colmatar dicha columna.

Por otra parte, la invención está basada igualmente en parte en la constatación de que estas micropartículas que han adsorbido las sustancias activas o que son aptas para hacerlo, son "fagocitables", cuando el tamaño de dichas micropartículas es lo suficientemente bajo, por las células que pertenecen al grupo de los fagocitos mononucleados que comprende los macrófagos, células dendríticas y otras células presentadoras del antígeno (APC). Otra observación inventiva hecha por los inventores, es que la introducción in vivo de estas partículas de tamaño fagocitable en el tejido subcutáneo atrae a las células del sistema de los fagocitos mononucleados y principalmente las células presentadoras del antígeno (APC), que se concentran en el lugar donde se encuentran las micropartículas del medicamento según la invención y que las fagocitan.

Así, el tamaño de las partículas del soporte mineral en forma de partículas es una característica importante de la invención. Según una disposición preferida, es juicioso que la granulometría del soporte mineral en forma de partículas sea inferior o igual a  $200\ \mu\text{m}$ , preferentemente inferior o igual a  $90\ \mu\text{m}$  y más preferentemente aún inferior o igual a  $50\ \mu\text{m}$ , de forma completamente preferida comprendido entre  $10$  y  $50\ \mu\text{m}$ , idealmente inferior a  $10\ \mu\text{m}$  y con una superficie específica comprendida entre  $0,1$  y  $5\ \text{m}^2/\text{g}$ , preferentemente entre  $0,3$  y  $2\ \text{m}^2/\text{g}$ . Es importante precisar que, debido a la degradabilidad del soporte y su estructura, las partículas se van a fraccionar en micropartículas con un tamaño inferior una vez inyectadas en el enfermo.

Por "granulometría", se entiende el tamaño medio de las partículas y más precisamente la media de la dimensión más grande de las partículas no esféricas o diámetro para las partículas esféricas. Los métodos de medida de la granulometría son convencionales, por ejemplo por difracción láser.

Estas características de granulometría se refieren más especialmente pero no limitativamente a los soportes sólidos en polvo, preferentemente a base de hidroxiapatito.

La forma de las partículas es igualmente importante, en efecto, las partículas con forma esférica están particularmente adaptadas a la aplicación según la invención, a diferencia de las partículas en forma de aguja.

- 5 Según una variante, el procedimiento según la invención comprende una etapa adicional efectuada después de la purificación y la fijación sobre el soporte según la invención, y según la cual los antígenos tumorales se desadsorben en una disolución de NaCl o un tampón fosfato 500 mM que se diluye entre 100 y 200 mM y se vuelve a pasar sobre una columna que comprende un soporte tal como se define en las reivindicaciones 10 a 13 de granulometría inferior a 10  $\mu\text{m}$ .
- 10 Según una variante, el soporte sólido puede no ser en polvo. En dicho caso, puede tratarse por ejemplo de una cerámica apta para degradarse in vivo por disolución de las uniones de los granos y liberación de las partículas constituidas por un número variable de granos. Cuando su tamaño es inferior o igual a aproximadamente 200, es decir 90 y mejor aún 50  $\mu\text{m}$ , las partículas son fagocitables por los macrófagos o las células gigantes que se acumulan en las zonas de degradación de la cerámica.
- 15 El soporte sólido (por ejemplo, cerámica) puede, después de haberse degradado en forma de granos, penetrar en las células por pino, endo y fagocitosis pudiendo transportar las moléculas biológicas y en particular los antígenos tumorales y los factores adyuvantes.
- 20 El soporte sólido puede estar compuesto por ejemplo por la asociación de una cerámica y uno o varios polímeros biocompatibles y degradables. Puede tratarse igualmente de un sólido como se ha descrito con moléculas orgánicas en su superficie que permiten fijar los antígenos en la superficie y/o tomar como diana determinados tipos celulares.
- 25 Los materiales biológicos adsorbibles o adsorbidos como antígenos se eligen ventajosamente en los constituyentes de las células tumorales, las moléculas, los orgánulos, los productos de transformación de las células (por ejemplo, triturados, liofilizados, dializados, sedimento de centrifugación...) así como los constituyentes de virus, bacterias endotoxinas y sus mezclas.
- 30 Preferentemente, los antígenos, preferentemente tumorales - naturales o sintéticos, modificados o no químicamente y/o físicamente y/o genéticamente entre otros - se seleccionan entre los antígenos membranares, los antígenos citoplásmicos, los antígenos extracelulares y sus mezclas.
- 35 Las moléculas biológicas adsorbibles o adsorbidas se eligen ventajosamente en el grupo de los factores adyuvantes siguiente: las proteínas - preferentemente las proteínas de choque térmico (HSP, "Heat Shock Proteins") -, los ácidos nucleicos, los lípidos, los fosfolípidos, los glúcidos, las glicoproteínas.
- 40 Estas HSP son principalmente pero no exclusivamente gp96, hsp70, hsp90 y hsp100. Las sustancias activas adsorbidas o adsorbibles sobre el soporte biocompatible pueden comprender igualmente genes que codifican los materiales y/o las moléculas biológicas tales como se han definido anteriormente, preferentemente para los antígenos tumorales y/o los factores adyuvantes - preferentemente citoquinas y/o linfoquinas - que permiten activar las células presentadoras del anticuerpo (APC).
- 45 Preferentemente, las sustancias activas pueden comprender los antígenos tumorales y/o los genes que codifican los antígenos tumorales y, más particularmente proteínas de choque térmico (HSP). Las moléculas biológicas son así por ejemplo antígenos tumorales asociados o no a HSP.
- 50 De forma completamente preferida, los antígenos tumorales se eligen entre:
- los antígenos cuya expresión está repartida en diferentes tipos histológicos de cánceres y más particularmente los antígenos MAGE (antígenos de melanoma), BAGE (antígenos de vejiga), GAGE (antígenos gástricos), RAGE (antígenos renales),  $\alpha$ -fetoproteína, MUC1, HER-2/neu y sus mezclas,
  - los antígenos codificados por genes mutados y más particularmente los genes Oncogenes ras, Genes supresores p53,  $\beta$ -catenina, Cdk4, la fusión de los antígenos bcr/abl, productos de genes virales (Epstein Barr, hepatitis B, papiloma), CASP-8 y sus mezclas,
  - los antígenos asociados a los tumores Antígeno carcino-embrionario, Antígeno prostático, RU2, Alt-M-CSF, Tirosinasa, Melan-A/MARTI, Gp100, Gp75, oncogén asociado a glioma, GLIP1 y/o
  - las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein), preferentemente la proteína gp96 y los péptidos asociados.
- La invención se refiere igualmente a un medicamento, preferentemente una autovacuna, caracterizado por que comprende los antígenos tumorales obtenidos por el procedimiento descrito anteriormente.
- Así, el medicamento según la invención comprende al menos un soporte sólido biocompatible, preferentemente en polvo, sobre el que se adsorbe o sobre el que está destinada a ser adsorbida, preferentemente sin necesitar un agente acoplador, al menos una sustancia activa, preferentemente elegida entre los materiales biológicos que comprenden el grupo de los antígenos contenidos en las células tumorales, sus orgánulos celulares, sus membranas, sus productos de transformación (triturados, liofilizados, dializados, sedimento de centrifugación...), los

virus, las bacterias, anticuerpos, endotoxinas y su mezcla, habiendo servido dicho soporte biocompatible para purificar dicha sustancia activa.

5 Por medicamento, hay que comprender que los dispositivos médicos, que comprenden por ejemplo un polvo mineral y al menos una sustancia activa, también están englobados. Se denomina agente acoplador a una fracción química que está unida de forma covalente al soporte sólido biocompatible y la sustancia activa. Puede tratarse principalmente de una unión covalente o de un radical orgánico.

10 La invención se basa en parte sobre la constatación de que estas micropartículas que han adsorbido las sustancias activas o que son aptas para hacerlo son "fagocitables", cuando el tamaño de dichas micropartículas es lo suficientemente bajo, por las células que pertenecen al grupo de los fagocitos mononucleados que comprende los macrófagos, células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos (APC). Otra observación inventiva hecha por los inventores, es que la introducción in vivo de estas partículas de tamaño fagocitable en el tejido subcutáneo atrae a las células del sistema de los fagocitos mononucleados y principalmente las APC, que se concentran en el lugar donde se encuentran las micropartículas del medicamento según la invención y que las fagocitan.

15 Los inventores han puesto de manifiesto el hecho de que una molécula adsorbida sobre una partícula, por ejemplo de HA, de tamaño fagocitable, penetra rápidamente, por ejemplo, en las APC. Sin que esto sea limitativo, esta penetración rápida puede explicarse de dos maneras: bien la molécula adsorbida se libera directamente en la célula después de haber sido fagocitada con la partícula del soporte, bien esta molécula se desadsorbe y se libera en los entornos inmediatos de la célula y penetra en ésta posteriormente.

20 Por ejemplo, cuando la proteína de choque térmico HSP gp96 se fija sobre las partículas de HA, puede liberarse mediante una disolución de fosfato de calcio con una concentración de 200-300 mM, que es una concentración que se encuentra in vivo en los líquidos intra y extracelulares.

Ventajosamente, este medicamento puede utilizarse para tratamientos autólogos por inmunoterapia, en particular como vacuna, preferentemente como vacuna anti-tumoral. Según una modalidad importante de la invención, los antígenos tumorales se preparan a partir del tumor del paciente, siendo entonces el medicamento una autovacuna.

25 Según una de las modalidades particularmente sorprendente de la invención, el medicamento comprende los antígenos tumorales adsorbidos sobre un soporte mineral en forma de partículas que ha servido para la purificación de dichos antígenos a partir de un extracto tumoral.

30 Las sustancias activas, materiales biológicos y más particularmente los agentes tumorales adsorbibles o adsorbidos sobre el soporte biocompatible y que constituyen por una parte el medicamento según la invención son aquellos que se han definido anteriormente.

35 En otra aplicación de la invención, el medicamento puede comprender además de las proteínas tumorales adsorbidas sobre el soporte mineral en forma de micropartículas, un cofactor estando dicho cofactor preferentemente en la forma de extractos tumorales, principalmente de triturados, liofilizados, dializados o sedimento de centrifugación. De forma completamente preferida, el cofactor proviene al menos en parte de un extracto tumoral y más particularmente del extracto tumoral a partir del cual se han purificado las proteínas tumorales pretendidas por adsorción sobre el soporte mineral en forma de partículas.

El medicamento según la invención contiene partículas sólidas biocompatibles, preferentemente, de fosfatos de calcio, que tienen de manera sorprendente e inesperada la propiedad de estimular el crecimiento y el rendimiento de los macrófagos y/o de otras células APC, tales como las células dendríticas.

40 La invención pretende por lo tanto igualmente un medicamento caracterizado por que está destinado a activar los macrófagos y/o otras células APC, es decir comportar la síntesis de sustancias elegidas en el grupo que comprende las citoquinas, las linfoquinas, los factores de crecimiento y/o convertir a las células dendríticas en maduras.

Otra característica ventajosa del medicamento se debe a que está destinado a ser fagocitado por los macrófagos y/o otras células APC y/o las células dendríticas.

45 El medicamento según la invención es igualmente importante porque permite el transporte in vivo de una o varias sustancias activas.

En otros términos, el soporte sólido (por ejemplo, fosfatos de calcio, en polvo o no -masivo-, cerámicos o no) según la invención permite vectorizar cualquier sustancia/molécula adsorbible, utilizando las células presentadoras del antígeno APC u otras células análogas.

50 Tratándose de su aplicación, el medicamento según la invención se caracteriza por que es implantable in vivo y/o administrable por inyección.

Según una modalidad interesante, el medicamento según la invención permite la liberación prolongada (por ejemplo durante algunas horas a varios días) in vivo de la (o las) sustancia(s) activa(s) adsorbida(s).

Una vez inyectado en el tejido conjuntivo, el medicamento según la invención puede comportar un flujo de entrada local de los macrófagos, de células dendríticas y/o de otras células APC presentadoras del antígeno o de los antígenos adsorbidos sobre el soporte.

5 La adsorción de la (o de las) sustancia(s) activa(s) sobre el soporte sólido según la invención puede operarse in vivo y/o ex vivo, siendo este soporte un polvo, preferentemente de hidroxipatito tal como se ha definido anteriormente.

Así, un medicamento que comprende un soporte sólido en polvo según la invención permite la percolación a través de una columna de dicho soporte de un triturado tumoral y la inyección de dicho polvo en el tejido subcutáneo o bien los ganglios linfáticos.

10 En la práctica, el medicamento según la invención comprende antígenos tumorales cuya cantidad es directamente proporcional a la superficie específica del polvo. De forma preferente, el medicamento comprende los antígenos tumorales a nivel de 20 mg/g de polvo de soporte mineral.

Cuando se emplea en la forma de una unidad galénica, el medicamento según la invención se emplea ventajosamente en una cantidad comprendida entre 15 y 100  $\mu$ g dosis/unidad galénica.

15 El soporte sólido aplicado en el medicamento según la invención, puede servir a la vez para purificar las sustancias activas, inmovilizar en su superficie las sustancias activas, inyectar/implantar y liberar las sustancias activas en el organismo o transportar las sustancias activas biológicas en las APC u otras células análogas.

La invención tiene igualmente por objeto la utilización del soporte sólido biocompatible, preferentemente en polvo, tal como se ha definido anteriormente, y, eventualmente, de al menos una sustancia activa igualmente definida supra, para preparar un medicamento tal como se ha definido anteriormente.

20 Otro objeto de la invención pretende un procedimiento de preparación de un medicamento, en particular tal como se ha descrito anteriormente, caracterizado por que consiste esencialmente en poner en contacto al menos un soporte sólido biocompatible, preferentemente en polvo, con al menos una sustancia activa, preferentemente elegida entre los materiales biológicos y/o las moléculas biológicas, de manera que la sustancia activa se adsorbe reversiblemente sobre el soporte.

25 Preferentemente, este procedimiento se caracteriza por que comprende la purificación de las sustancias activas, eventualmente autólogas, que pueden utilizarse para provocar una inmunoterapia, comprendiendo este procedimiento las etapas esenciales siguientes:

- Poner en contacto la o las sustancias activas con un polvo de fosfato de calcio durante un tiempo suficiente para que se produzca la inmovilización/adsorción de al menos una parte de la o las sustancias activas - preferentemente al menos un factor inmunitario y/o al menos un factor adyuvante - sobre el polvo;
- Recuperar el polvo que ha inmovilizado al menos una parte de la o las sustancias activas, para preparar un medicamento administrable a un paciente que padece por ejemplo un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad auto-inmune, pudiendo provenir esta o estas sustancias activas del paciente en el caso de un tratamiento autólogo.

35 En una variante, este procedimiento se caracteriza por que comprende la purificación de factores autólogos que pueden utilizarse para provocar una reacción inmunitaria anti-tumoral, comprendiendo este procedimiento las etapas esenciales siguientes:

- Poner en contacto un triturado de tumor con un polvo de fosfato de calcio durante un tiempo suficiente para que se produzca la inmovilización de determinados factores moleculares - preferentemente al menos un factor inmunitario y/o al menos un factor adyuvante - sobre el polvo;
- Lavar el polvo con una o varias disoluciones salinas de diversas molaridades y/o pH para eliminar las moléculas no adsorbidas.
- Recuperar el polvo que ha inmovilizado determinados factores moleculares para preparar un medicamento inyectable en el organismo del individuo que padece el tumor del que se ha extraído el triturado.

45 En la práctica, la puesta en contacto puede ser, por ejemplo, una purificación realizada mediante una o varias columnas separadas o no por un sistema de depósito en el que pueden introducirse o sustraerse determinadas disoluciones y a través de la cual o de las cuales se puede haber percolado un triturado de tumor.

50 Siempre en la práctica, la recuperación de la (o de las) sustancia(s) activa(s) puede operarse, por ejemplo, por elución de la (o de las) columna(s) mediante una disolución de tampón - preferentemente tampón fosfato - con una molaridad y pH apropiados, comprendiendo el eluato así obtenido los antígenos tumorales y/o los factores adyuvantes inmovilizados y buscados. Se trata aquí de una técnica de cromatografía.

Puesto que no se trata de cromatografía, la recuperación de la (o de las) sustancia(s) activa(s) se opera por la recuperación del polvo que ha adsorbido los antígenos tumorales y/o los factores adyuvantes inmovilizados y buscados.

5 Gracias a las propiedades de adsorción selectiva del soporte sólido utilizado según la invención, es posible efectuar una dosificación de las sustancias activas adsorbidas después de la desorción.

Esta dosificación puede realizarse por ejemplo por el control de la superficie específica del soporte medida por adsorción gaseosa (medida BET). Sin embargo, todos los métodos de análisis conocidos son factibles.

Para ilustrar esta facultad de adsorción selectiva, se puede señalar que la gp96, por ejemplo, se fija a la superficie de las partículas de HA a molaridades de tampón fosfato bajas. Se desorben de los polvos entre 200 mM y 300 mM.

10 La invención pretende además y entre otros:

- un procedimiento de preparación de un medicamento caracterizado por que comprende el procedimiento de preparación de los antígenos tumorales tal como se ha descrito aquí anteriormente. De forma preferida, este procedimiento aplica un extracto tumoral preparado a partir del tumor del paciente, siendo dicho medicamento una autovacuna. Según una aplicación particular de dicho procedimiento, los antígenos tumorales purificados adsorbidos sobre el soporte en forma de partículas, eventualmente mezclados al menos con un cofactor, están en la forma de una preparación inyectable.
- un procedimiento de purificación de moléculas/materiales biológicos del tipo de los definidos aquí anteriormente, y en particular las proteínas de choque térmico HSP y/o los antígenos anti-tumorales; que consiste en utilizar el soporte sólido tal como se ha definido aquí anteriormente como medio de adsorción/desorción selectiva;
- un sistema de purificación que contiene un polvo definido aquí anteriormente, y constituido por una o varias columnas separadas o no por un sistema de depósito en el que pueden introducirse o sustraerse determinadas disoluciones y que permiten a partir de la introducción de un triturado de tumor en el sistema la obtención a la salida de un polvo inyectable sobre el que están adsorbidos los antígenos tumorales y/o los factores adyuvantes. Este sistema de purificación comprende ventajosamente un sistema de introducción del polvo en el organismo, amovible y que permite inyectarlo o proyectarlo en el tejido subcutáneo del paciente.
- métodos terapéuticos que consisten en administrar el medicamento según la invención para el tratamiento y/o la prevención principalmente de cánceres, de enfermedades infecciosas o de enfermedades auto-inmunes;
- métodos terapéuticos que consisten en administrar el medicamento según la invención para el tratamiento y/o la prevención por inmunoterapia (por ejemplo, autólogos), principalmente de cánceres, de enfermedades infecciosas o de enfermedades auto-inmunes;
- y vacunas autólogas que comprenden el medicamento según la invención para el tratamiento y/o la prevención principalmente de cánceres, de enfermedades infecciosas o de enfermedades auto-inmunes.

35 Se desprende principalmente de la exposición anterior de la invención que las partículas de HA son un buen vector para transportar la proteínas de choque térmico al interior de los macrófagos y de las células que presentan los antígenos como muestran los ejemplos siguientes.

Fig. 1: presentación del antígeno por las APC a las células efectoras de la reacción inmunitaria, los linfocitos T.

40 Fig. 2: el antígeno una vez fagocitado se fragmenta en péptidos que se asocian a CMH para poder ser reconocidos por los linfocitos.

Fig. 3 A: corte histológico de partículas de fosfatos de calcio implantadas en una mandíbula de conejo que porta un vector plasmídico de un gen Lac-Z que muestra una acumulación de macrófagos y de APC alrededor de las partículas.

45 Fig. 3B: corte histológico de partículas de fosfatos de calcio implantadas en una mandíbula de conejo que porta un vector plasmídico de un gen Lac-Z que muestra una acumulación de macrófagos y de APC alrededor de las partículas. El revelado de la actividad galactosidasa muestra que todas las células cercanas están transfectadas.

Fig. 4: corte en microscopía electrónica de transmisión de células medulares cultivadas en contacto con partículas de HA después de la desmineralización. Existen numerosas vesículas citoplásmicas vacías que contenían las partículas antes de su disolución.

50 Fig. 5: ARNm de TNF- $\alpha$ /ARNm de actina  $\beta$ .

Fig.6: ARNm de IL-6/ARNm de actina  $\beta$ .

Fig. 7: transferencia en ranura de diferentes fracciones de triturado de tumores recogidos a la salida de una columna de HA. La fracción obtenida por lavado con 200 mM de tampón fosfato muestra el mejor rendimiento en gp96 (HSP) (barra negra en la parte superior de la electroforesis).

5 Fig. 8: transferencia western de la fracción 200 mM.

### Ejemplo 1:

#### Capacidad de transporte intracelular por las partículas de HA de moléculas biológicas al interior de macrófagos y de células gigantes:

10 En este experimento, se utilizan 2 mg de partículas de HA. Las características del polvo son las siguientes: granulometría 45-80  $\mu\text{m}$ ; superficie específica: 0,7  $\text{m}^2/\text{g}$ ; forma esférica; carga de superficie negativa, potencial de superficie -37 mV, hidrófobas. Un plásmido que porta un gen de la galactosidasa (Lac-Z) se adsorbe en la superficie de los polvos según el protocolo siguiente: 25  $\mu\text{g}$  de plásmido se diluyen en 2 ml de tampón fosfato pH 6,8, 0,1 M. El polvo se incuba dos horas en la disolución de plásmido a 37<sup>0</sup>C y se seca.

15 Los 2 mg de polvo se implantan en un defecto óseo efectuado en la unión del ligamento de los incisivos de mandíbulas de conejos. Los animales se sacrifican a las tres semanas y las mandíbulas se extraen. Se efectúan cortes histológicos y la actividad galactosidasa de las células se pone de manifiesto por la reacción con GalX antes de observarlas por microscopía óptica.

20 Existe una acumulación de macrófagos y de células gigantes alrededor de las partículas de polvo (fig. 3A y 3B). Todas las células en la periferia de los polvos tienen una actividad galactosidasa, lo que sugiere que el plásmido ha migrado de la superficie de los polvos al interior del núcleo de los macrófagos. Son visibles fragmentos de partículas en los citoplasmas lo que indica que han sido fagocitadas. Hay numerosas células mononucleadas o plurinucleadas que expresan el gen lac-Z que han migrado a la superficie de las trabéculas a distancia de las partículas.

Este experimento muestra que:

- 25 • el ADN inmovilizado en la superficie de las partículas de HA se transporta preferentemente al interior de las células que presentan el antígeno.
- estas células migran con las moléculas que contienen.

### Ejemplo 2:

#### Degradación de las partículas de polvo:

30 Se introducen 10 mg de polvos estériles con las características del ejemplo 1 en un matraz de cultivo que contiene una capa confluyente de una línea primaria de células medulares humanas. Las células se cultivan en contacto con los polvos en un medio DMEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal y glutamina a 37<sup>0</sup>C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 días. Se examinan por microscopía óptica. Manifiestan una actividad fosfatasa ácida que indica que estas células pertenecen al sistema de los fagocitos mononucleados. Numerosas partículas o fragmentos de cerámicas están en contacto o incluidos en el citoplasma. Las células se fijan en una disolución de 35 4% de glutaraldehído, se desmineralizan en una disolución de EDTA y se incluyen en un polímero epoxi. Se hacen cortes de 20 angströms y se examinan por microscopía electrónica de transmisión. Hay numerosas vesículas vacías en el citoplasma celular que indican el emplazamiento de las partículas antes de la desmineralización (fig. 4).

Por lo tanto, se comprueba que las partículas de HA se degradan emitiendo granos que son fagocitados por las células que presentan los antígenos.

### 40 Ejemplo 3:

#### Activación de las APC por las partículas:

45 Se introducen diversas partículas de hidroxiapatito en un matraz de cultivo que contiene una línea primaria de monocitos humanos antes de la confluencia. Las células están en contacto con los polvos, cuyas características se proponen en la tabla 2, durante 6 ó 18 horas. La densidad celular en la siembra de los matraces de cultivo es de 2.10<sup>5</sup> células /ml. El medio de cultivo es RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal. Las células se cultivan a 37<sup>0</sup>C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La masa de polvo introducida en el cultivo es la masa necesaria para que la relación superficie de las células/superficie del polvo sea igual a 1. Las cantidades de ARNm de TGF- $\beta$  y de IL-6 se dosifican a las 6 y 18 horas (fig. 5 y 6).

Tabla 2: características de los polvos:

	HA1	HA2	HA3	HA4	HA5	HA6	HA7	HA8	HA9	HA10	HA11	HA12
Granulometría (µm)	1-30	1-30	10-70	110-190	170-300	1-30	1-30	1-30	100-250	150-300	1-30	1-30
Tamaño medio (µm)	3	3	44	140	217	3	3	3	166	196	2	2
Sinterización (°C)	600	1.180	1.180	1.180	1.180	20	600	1.180	1.180	1.180	20	600
Superficie específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	23,95	5,38	1,56	0,63	0,5	38,06	26,72	6,08	0,7	0,7	18,51	13,18
Tamaño de los granos (nm)	190	350	350	350	350	80	180	350	420	350	200	300
Forma (1)	S	S	S	S	S	Q	Q	Q	Q	Q	A	A

(1) Forma de los granos: S= Esfera; Q= Cualquiera; A= Aguja

- 5 Los resultados muestran que las características de las partículas de hidroxiapatito influyen en su aptitud para hacer que las APC que les han fagocitado sinteticen las interleuquinas y TGF-β a, es decir, para activarlas. Las partículas en forma de aguja son las más inflamatorias. En lo que respecta a las demás formas, las partículas más pequeñas son las más inflamatorias. Se sabe que las partículas de polvo de HA se degradan durante su implante tisular y que los restos más pequeños son emitidos, lo que permite amplificar la activación de los macrófagos.

**Ejemplo 4:**

- 10 Purificación de las proteínas de choque térmico gp96 sobre lechos de polvo de HA inyectable

La purificación se efectúa según las etapas siguientes:

Preparación del soporte:

- 15 Se rehidratan 10 g de polvo ocho horas en un tampón fosfato de baja fuerza iónica (0,01 M, pH 6,8) a temperatura ambiente en un volumen igual a 4 a 5 veces el volumen del polvo. El exceso de tampón se retira con las partículas que no han sedimentado. El polvo se vuelve a poner en suspensión en un exceso de tampón y se vierte en la columna cuyo extremo inferior está cerrado. Se deja decantar durante algunas horas y el tampón se evacua por la parte inferior de la columna. La columna se equilibra en un tampón fosfato (0,01 M, pH 6,8). La columna se lava en una tampón fosfato 30 mM, pH 6,8 (20-30 veces el volumen de la columna).

Percolación de la suspensión a través de la columna que contiene HA:

- 20 La carga de proteína (precipitado del triturado de tumor al que se adiciona tampón fosfato 30 mM, pH 6,8, en una proporción de 1/10) se introduce en la columna.

Lavado de la columna:

La columna se lava con un gradiente de tampón fosfato de 0 a 500 mM.

Recogida del soporte y de las fracciones proteicas.

- 25 **Ejemplo 5:**

Control de las fracciones proteicas obtenidas por fraccionamiento en columna de HA a diferentes molaridades de tampones fosfato:

- 30 Se efectúan dos controles de las diversas fracciones, por los métodos de electroforesis transferencia en ranura y transferencia western que son métodos muy conocidos. Los resultados de la electroforesis muestran que la mayoría de las proteínas gp96 se desprenden del HA a 200 mM. La transferencia western muestra que la fracción proteica es casi pura a esta molaridad (figuras 7 y 8).

**Ejemplo 6:**

Preparación de una autovacuna

Todas las manipulaciones siguientes se efectúan en condiciones estériles.

1. Preparación del tejido tumoral y congelación.

5 El tejido tumoral se extrae (aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) durante una biopsia realizada en condiciones estériles y se congela inmediatamente.

2. Trituración del extracto tumoral

El tejido tumoral se tritura en un mortero y los fragmentos se pasan a un tubo de Kahn sobre un lecho de hielo.

3. Dilución del triturado en una disolución de NaHCO<sub>3</sub>

10 El triturado obtenido en la etapa 2 se mezcla con 750 µl de NaHCO<sub>3</sub>, 30 mM, pH 7. El tejido se homogeneiza con un triturador de cuchillas.

4. Separación del sedimento y del sobrenadante por centrifugación

15 El homogenado se transfiere a un tubo Eppendorf y se centrifuga entre mil y dos mil g durante 30 mn a 4<sup>o</sup>C. Se obtienen dos fracciones, una de ellas corresponde al sobrenadante que comprende las proteínas tumorales en suspensión y en disolución, la otra corresponde al sedimento y comprende las fracciones membranas.

5. percolación de la suspensión sobre una columna de hidroxapatito (HA).

*Preparación de la columna:*

20 Se prepara una columna de polvo de HA: el polvo se pone en suspensión en un tampón fosfato (20 mM, pH 7), se deja sedimentar 30 segundos y el sobrenadante se desecha con el fin de eliminar las partículas finas en suspensión susceptibles de colmatar la columna durante el paso de la disolución de proteínas. La columna se lava con 10 veces el volumen representado por el polvo con una disolución de tampón fosfato.

*Percolación del sobrenadante sobre la columna de HA:*

25 Las proteínas del sobrenadante obtenido en la etapa 4 se precipitan con una disolución de sulfato de amonio y el precipitado se recoge en una disolución de tampón fosfato en el que las proteínas están solubilizadas o en suspensión. La disolución que contiene las proteínas tumorales en suspensión y solubilizadas se percola sobre lecho de cerámicas con el fin de recuperar las proteínas de choque térmico (gp96).

1. Lavado de la columna

30 Cuando la disolución de proteínas ha penetrado en el lecho de HA, la columna se lava con 4 a 5 veces su volumen de tampón fosfato (20 mM, pH 7). La columna se lava con un gradiente de tampón fosfato o de cloruro de sodio de 0-200 mM de 4 a 5 veces el volumen del polvo.

2. Preparación del cofactor

El sedimento obtenido en la etapa 4 se vuelve a poner en suspensión en 400 µl de tampón fosfato (20 mM, pH 7).

35 Se prepara un gradiente de sacarosa por tramos de 400 µl, 40, 35 y 30% en el que se depositarán 200 µl del sedimento obtenido en la etapa 1. El gradiente así cargado en extracto tumoral se centrifugará a 1.500 g durante 30 mn a 4<sup>o</sup>C. La fracción que contiene los fragmentos membranosos situada en la interfase de sacarosa 40/35% se recupera.

3. Preparación de la mezcla a inyectar.

40 El polvo en suspensión que ha adsorbido las proteínas del sobrenadante obtenido al final de la etapa 4 se asocia con la disolución de membranas obtenida en la etapa 3 (20 mg para 100 µl). La mezcla se introduce en una jeringa en la que el volumen de la mezcla se adapta eventualmente por la adición de una disolución de NaCl (9/1.000).

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de antígenos tumorales, preferentemente de proteínas tumorales y de forma más preferente aún de proteínas tumorales autólogas, destinado a ponerlas en una forma reconocible por el sistema inmunitario caracterizado por que consiste esencialmente en:
- 5 a. aplicar un extracto tumoral,
- b. poner en contacto este extracto tumoral con un soporte mineral en forma de partículas biocompatible sólido, preferentemente en polvo, apto para adsorber selectivamente los antígenos tumorales pretendidos y vectorizarlos *in vivo* a título de sustancias activas sobre el sistema inmunitario,
- 10 c. hacerlo de manera que el soporte mineral en forma de partículas adsorba selectivamente los antígenos tumorales de interés,
- d. separar el soporte mineral del extracto tumoral no adsorbido,
- e. recoger los antígenos tumorales de interés en forma purificada y adsorbida sobre el soporte mineral en forma de partículas.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el extracto tumoral aplicado en la etapa a. es un extracto tumoral autólogo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que comprende una etapa adicional de mezcla de los antígenos tumorales purificados y adsorbidos sobre el soporte con al menos un cofactor apto para promover la acción de los antígenos tumorales sobre el sistema inmunitario, obteniéndose preferentemente dicho cofactor de los extractos tumorales, principalmente de triturados, liofilizados, dializados o sedimento de centrifugación.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- a. preparación del extracto tumoral que permite la suspensión o solubilización de los antígenos tumorales de interés,
- b. percolación de la suspensión o de la disolución a través de al menos una columna que contiene el soporte mineral en forma de partículas,
- 25 c. lavado de la columna con disoluciones tampón de fuerza iónica y pH determinados,
- d. recogida del soporte que ha adsorbido los antígenos tumorales.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que un primer lavado de la columna se efectúa con un tampón fosfato o una disolución de NaCl con una concentración inferior o igual a 200 mM y/o por que un segundo lavado se efectúa con un tampón fosfato o una disolución de NaCl con una concentración comprendida entre 300 a
- 30 500 mM.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado por que la preparación del extracto tumoral comprende las etapas siguientes:
- a. eventualmente congelación del tejido tumoral,
- b. trituración del tejido tumoral,
- 35 c. solubilización o suspensión de los antígenos tumorales en una disolución de NaHCO<sub>3</sub>,
- d. centrifugación,
- e. separación del sedimento y del sobrenadante.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el soporte mineral en forma de partículas se elige entre los materiales que presentan todas o parte de las propiedades siguientes:
- 40 – presencia de al menos uno de los grupos ionizados o ionizables PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, OH<sup>-</sup> y/o Ca<sup>2+</sup> en la superficie de dicho material,
- pH de superficie básico,
- carga de superficie negativa,
- hidrófobo.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el soporte mineral en forma de partículas se elige:
- en el grupo que comprende los minerales cálcicos, preferentemente los fosfatos de calcio y más preferentemente aún los hidroxiapatitos, o
- 5    – entre las cerámicas, preferentemente una cerámica de fosfato de calcio, en particular un hidroxiapatito, un fosfato trí, tetra u octocálcico en forma de partículas.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los antígenos tumorales comprenden:
- 10   a. los antígenos cuya expresión está repartida en diferentes tipos histológicos de cánceres y más particularmente los antígenos MAGE (antígenos de melanoma), BAGE (antígenos de vejiga), GAGE (antígenos gástricos), RAGE (antígenos renales),  $\alpha$ -fetoproteína, MUC1, HER-2/neu y sus mezclas,
- b. los antígenos codificados por genes mutados y más particularmente los genes Oncogenes ras, Genes supresores p53,  $\beta$ -catenina, Cdk4, la fusión de los antígenos bcr/abl, productos de genes virales (Epstein Barr, hepatitis B, papiloma), CASP-8 y sus mezclas,
- 15   c. los antígenos asociados a los tumores Antígeno carcino-embriionario, Antígeno prostático, RU2, Alt-M-CSF, Tirosinasa, Melan-A/MARTI, Gp100, Gp75, oncogén asociado a glioma, GLIP1 y/o
- d. las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein), preferentemente la proteína gp96 y los péptidos asociados.
- 20   10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que después de la purificación y fijación sobre el soporte tal como se ha definido en las reivindicaciones 7 u 8, los antígenos tumorales se desadsorben en una disolución de NaCl o un tampón fosfato 500 mM que se diluye entre 100 y 200 mM y se vuelve a pasar sobre una columna que comprende un soporte tal como se ha definido en las reivindicaciones 7 u 8 de granulometría inferior a 10  $\mu$ m.

FIG. 1

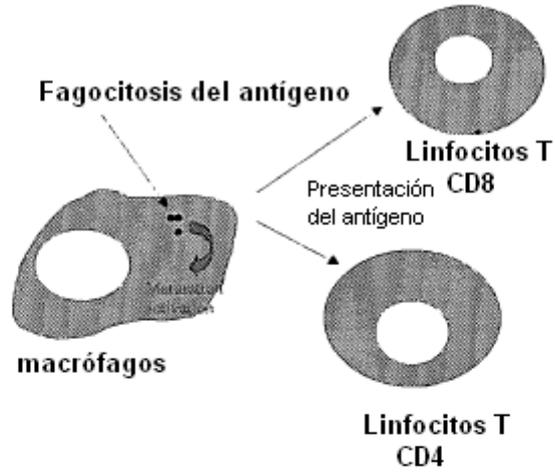


FIG. 2

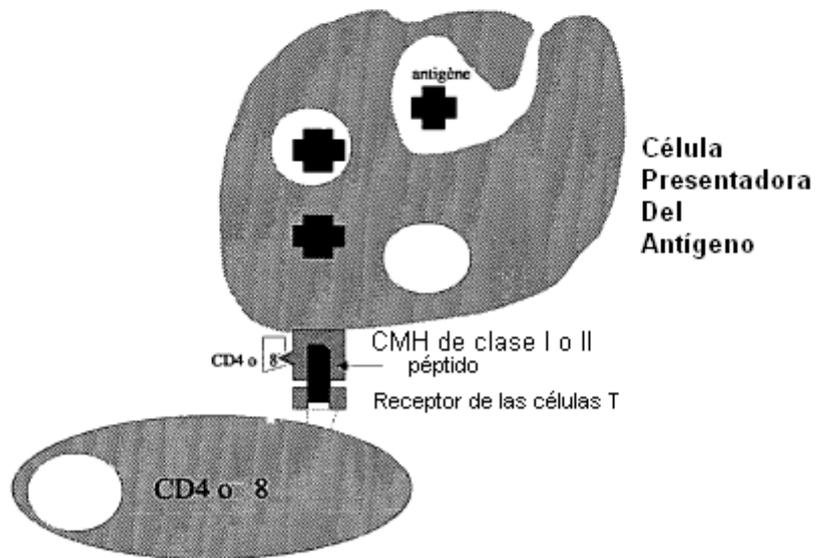


FIG. 3A

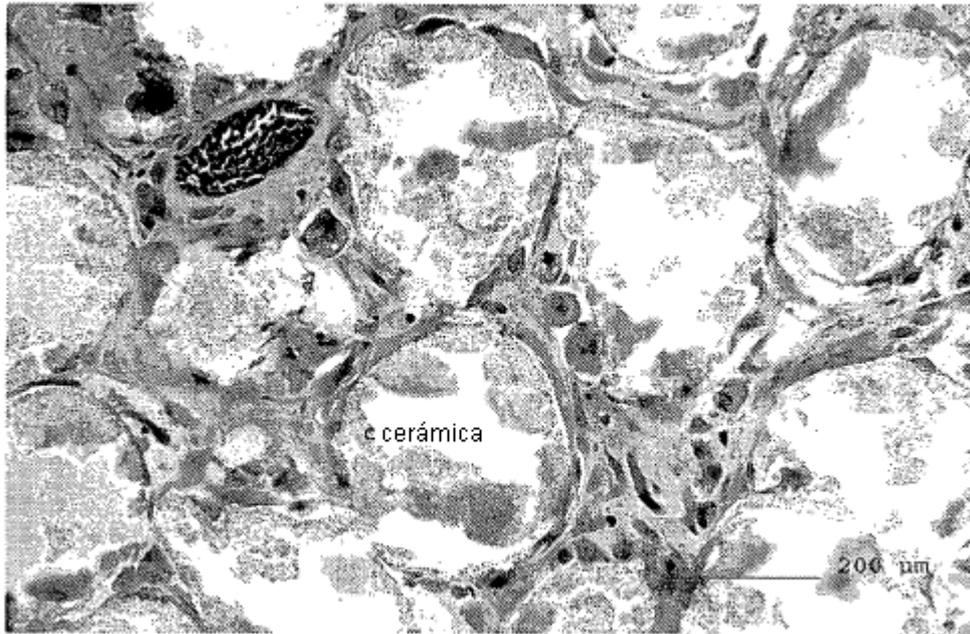


FIG. 3B

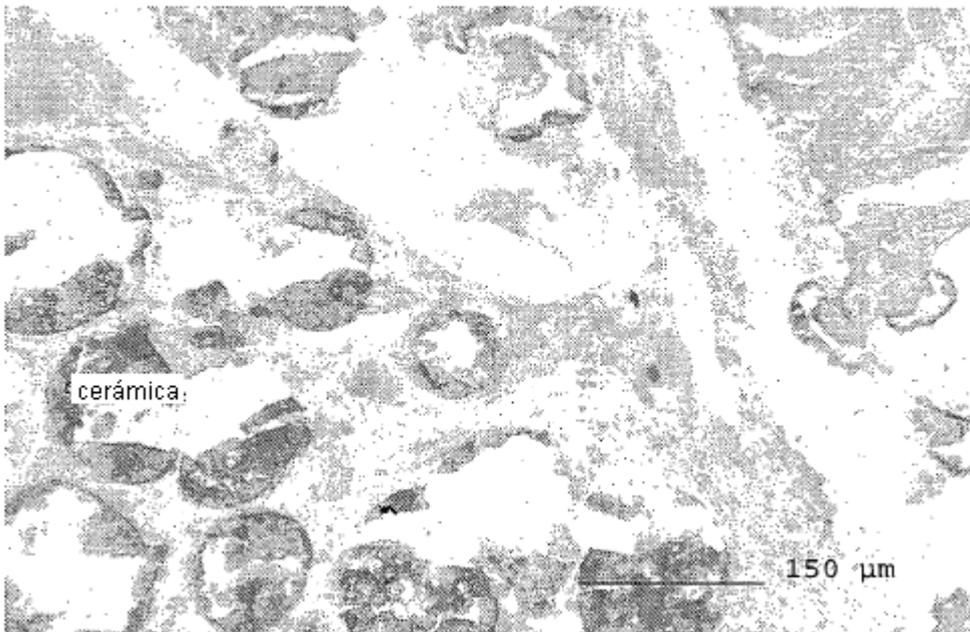


FIG. 4

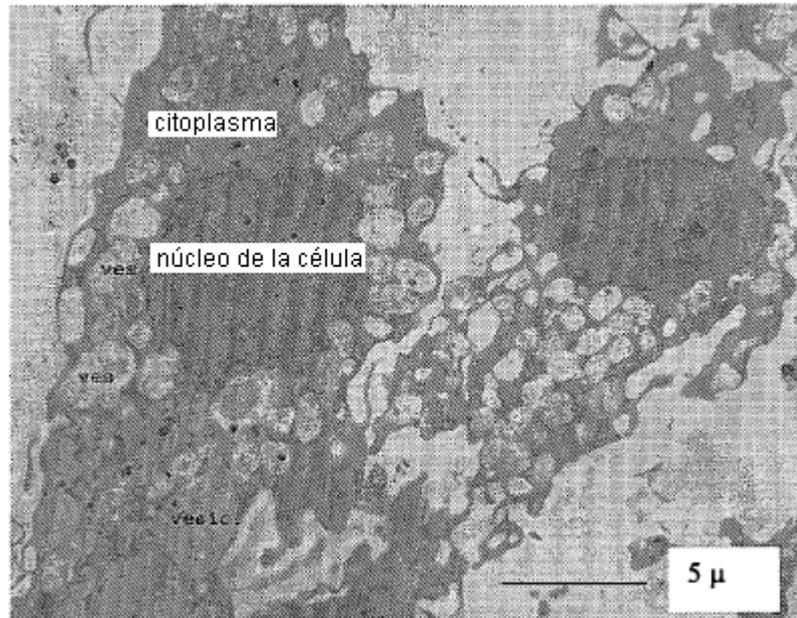


FIG. 5

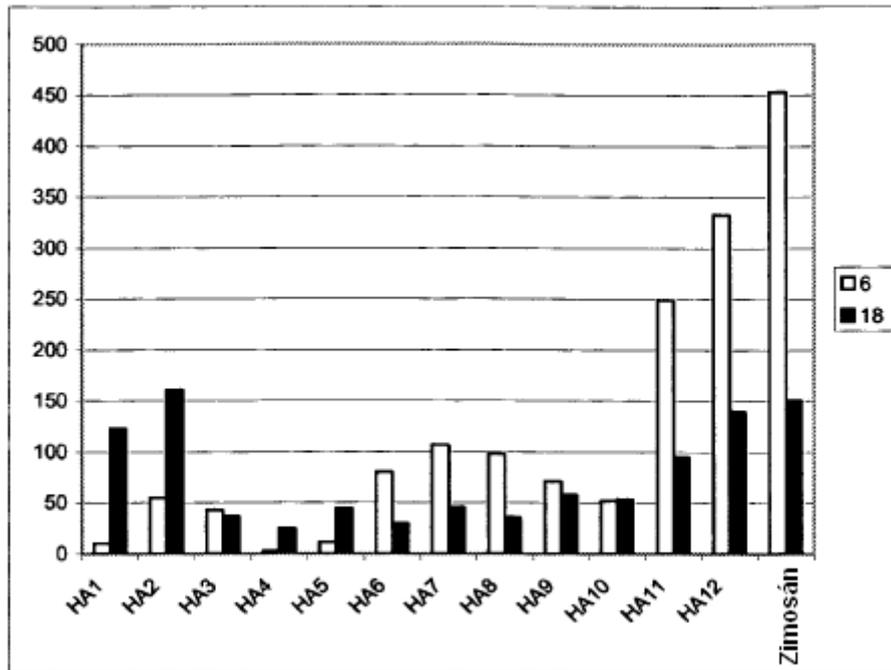


FIG. 6

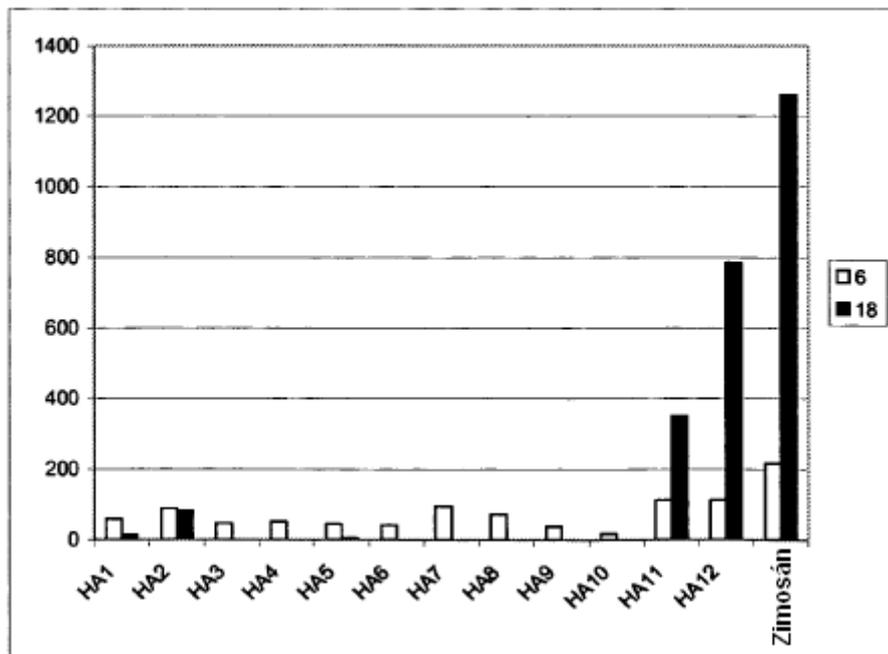


FIG. 7

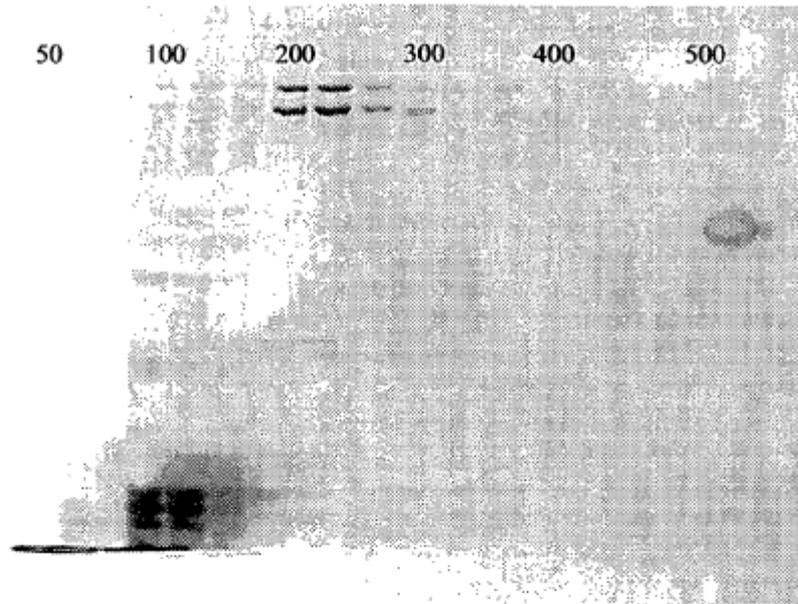


FIG. 8

TRANSFERENCIA WESTERN - GP96

Fracciones de 200

