COMPOSICIONES VACUNALES BASADAS EN NANO-PARTICULAS INORGANICAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con la biotecnología, específicamente con el campo de la salud humana. Particularmente describe nuevas formulaciones vacunales que contienen sistemas nano-particulados con respuesta inmunológica contra el factor de crecimiento epidérmico, útiles para su uso en terapias contra el cáncer.

ANTECEDENTES

Los tumores en tejidos de origen epitelial generalmente sobre-expresan en su superficie el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La unión del EGF autólogo con su receptor (EGFR), activa mecanismos en el tumor que conducen a su crecimiento y al escape de la protección que confiere el sistema inmunológico. A partir de ese conocimiento, desde la década de 1990 se identificó al EGF como un blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer de pulmón y otros de origen epitelial, en los que resulta relevante la unión del EGF con su receptor.

La inmunoterapia pasiva usando anticuerpos cuyo blanco es el EGFR ha sido objeto de muchas investigaciones. Previamente se demostró que el reconocimiento específico del receptor por anticuerpos de origen murino inhibe la estimulación mitogénica de las células malignas (Sato J.D. y cols., Methods in Enzymology (1987) 146:63-81). En otro estudio publicado en la patente US 5,891,996, se describen anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que pueden jugar un rol diagnosticador o terapéutico para combatir tumores de alta expresión del EGFR.

En los últimos años se ha extendido el uso de las inmunoterapias activas, estas abren nuevas esperanzas en la lucha contra el cáncer y de transformar esta enfermedad en crónica. A diferencia del tratamiento pasivo, basan su funcionamiento en la activación del sistema inmunológico para que actúe contra el tumor u otros elementos que intervienen en su desarrollo. Entre otras ventajas, reducen la toxicidad pues requieren de la dosificación de pequeñas cantidades de principios activos.

La formulación referida en la patente US 5,894,018, reivindica la composición de una vacuna para producir respuesta inmune contra el EGF autólogo. Comprende al EGF autólogo conjugado a una proteína transportadora (toxina B del cólera, toxoide tetánico, un anticuerpo monoclonal o una proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*), administrada junto al adyuvante hidróxido de aluminio. Por su parte, en la invención US 8,778,879 se describe una composición vacunal para su uso terapéutico en pacientes de cáncer que tiene como principio activo al conjugado químico entre el EGF humano recombinante (rhEGF) y la

proteína recombinante P64k. Se refiere a un procedimiento para la purificación del conjugado químico que le aporta mayor pureza e incremento en su actividad inmunogénica. Dicha composición contiene un adyuvante que puede ser hidróxido de aluminio o Montanide.

En estudios clínicos posteriores se evidenció que la vacuna terapéutica derivada de las invenciones mencionadas anteriormente, es segura y eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), en estadios avanzados de la enfermedad (Rodríguez P. C. y cols., Clinical Cancer Research (2016), 22 (15): 3782-3790). Sin embargo, los enfermos que logran alta supervivencia (cinco años o más), sufren afectaciones en los músculos de los sitios de inyección (deltoides y glúteos), por la acumulación del aceite mineral que contiene el adyuvante; lo que provoca que algunos pacientes tengan que interrumpir el tratamiento o inocular el producto en músculos más alejados de los órganos linfoides.

Los adyuvantes inmunológicos surgieron por la necesidad de incrementar la inmunogenicidad de las vacunas desarrolladas a partir de proteínas recombinantes. El primer adyuvante utilizado fue el sulfato doble de aluminio, en 1926. Posteriormente se han evaluado diversos adyuvantes inorgánicos a partir de aluminio, calcio, magnesio, hierro, cinc, circonio, cerio, berilio y silicio. Sin embargo, solo se ha aprobado el uso en humanos de sales de aluminio y de calcio (Paneque-Quevedo A., Biotecnología Aplicada (2013) 30: 243-249). En todos los estudios anteriores, se utilizaron adyuvantes inorgánicos en combinación con antígenos heterólogos.

El hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio son adyuvantes poco apropiados para utilizarse en tratamientos crónicos, debido a que el aluminio es tóxico y poco metabolizable por el organismo humano. Se ha documentado ampliamente el impacto de la acumulación de aluminio sobre la salud humana, específicamente sobre los sistemas: nervioso central, músculo-esquelético, respiratorio, cardiovascular, endocrino, urinario y reproductivo (Nayak P., Environmental Research Section A (2002), 89: 101-115; Verstraeten S. A. y cols., Arch Toxicol (2008) 82: 789-802; Flaten T. P., Brain Research Bulletin (2001) 2: 187-196).

Por otra parte, los fosfatos de calcio (en lo adelante CaP) son sustancias inorgánicas que han demostrado su utilidad como adyuvantes inmunológicos. En la patente de invención US 2,967,802; se reivindica la mezcla de un antígeno de la erisipela con un gel de CaP hidratado. En estudios y patentes posteriores se desarrollaron vacunas profilácticas contra infecciones de varios microorganismos patogénicos y alérgenos adsorbidos en CaP (US 3,608,071, US 4016252; US 4350686; US 20120121714; Coursaget, P. y cols., Infect Immun (1986) 51(3): 784-787).

Al igual que el hidróxido y el fosfato de aluminio, los adyuvantes de CaP basan su efecto inmunológico en la formación de un depósito del antígeno que se libera lentamente, con lo

cual permiten que se presente al sistema inmunológico durante un tiempo prolongado y se genere una respuesta contra el antígeno inoculado. La patente US 8,333,996 reivindica el desarrollo de sistemas inmunológicos formados por la adsorción de antígenos tales como: *Bordetella pertusis*, alérgenos, virus inactivados de inmunodeficiencia humana (HIV-2), KLH, vacunas contra la difteria, toxoide tetánico, estreptococos, virus o bacterias atenuadas, polio y hepatitis A y B. También incluye la adsorción de ADN y citoquinas, tales como el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

En la patente US 6,355,271 se reclama un método para preparar partículas de CaP con diámetros entre 300 y 4000 nm, se basa en la mezcla acuosa de cloruro de calcio, fosfato de sodio y citrato de sodio para la adsorción de los virus HSV-1, HSV-2 y EBV, ADN, así como los antígenos ovalbúmina y de *Mycobacterium tuberculosis*.

En estudios recientes se ha evaluado el uso de CaP como adyuvante de vacunas o para la liberación de diversos fármacos. Se destaca en ellos el desarrollo de sistemas particulados de hidroxiapatita, $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, en lo adelante HAp), preferentemente en forma de nano-partículas. Esta sustancia es el principal componente inorgánico del tejido óseo, lo cual garantiza su biocompatibilidad. Además, las HAp amorfas o con baja cristalinidad se biodegradan en contacto con el medio biológico. La reducción del tamaño de las partículas y el material seleccionado, le confieren propiedades superiores como adyuvante, con respecto al hidróxido de aluminio pues producen una respuesta Th1/Th2 más equilibrada y menor generación de anticuerpos de tipo IgE (Qing, H. y cols. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (2000) 7(6): 899-903; Jones, S. y cols., Vaccine (2014) 32: 4234-4242; Lin, Y. y cols., Expert Review of Vaccines (2017), 16(9): 895-906. Además, reduce los efectos adversos en el sitio de la inyección debido a que esta sustancia es biocompatible y en su forma amorfa resulta biodegradable.

En la invención WO 2005084637 se reivindica un sistema que comprende: un núcleo de nano-partícula de CaP, una macromolécula biológicamente activa encapsulada en la partícula del núcleo y un agente modificador de la superficie. La macromolécula biológica activa puede ser una proteína, un polipéptido, un polisacárido, un ácido nucleico, un polinucleótido, un lípido o un carbohidrato.

Por otra parte, en la invención WO 2003051394 se muestra una HAp nano-particulada con diferentes tipos de recubrimientos en una única formulación para usarla como adyuvante. En ella se emplean nano-partículas como transportadores de antígenos nativos o recombinantes u otros agentes farmacológicos, para su aplicación en las superficies de las mucosas.

En otros estudios, se reivindican desarrollos y aplicaciones del CaP en general y específicamente las nano-partículas de HAp como adyuvantes inmunológicos o para el

transporte de sustancias activas, para el tratamiento de enfermedades infecciosas o del sistema inmune, incluido el cáncer (US 5,443,832; US 6,355,271; US 6,767,550; US 20020068090; US 7,776,600; WO 2017025359).

Ninguno de los reportes anteriores describe composiciones vacunales que induzcan respuesta inmune específica contra el EGF u otra proteína autóloga, construidas sobre la superficie de partículas de CaP, a partir de su unión química con moléculas de rhEGF y una proteína transportadora de forma independiente, o por la conjugación de ambas. En una de las variantes desarrolladas en la presente invención, se produce respuesta inmunológica anti-EGF sin que se requiera unir químicamente al rhEGF con una proteína transportadora.

La novedad de esta invención consiste en proporcionar nuevas composiciones vacunales para el tratamiento crónico del cáncer, formadas por un núcleo de nano-partículas inorgánicas biodegradables, unidas químicamente a antígenos autólogos. Mediante la combinación de partículas de CaP, específicamente HAp, con dimensiones en escala nano o submicrométrica, con rhEGF o uno de sus péptidos y otra proteína o péptido transportador capaces de generar respuestas inmunológicas contra el EGF. Estas nuevas composiciones superan las ya existentes para producir una respuesta contra el EGF, en cuanto a no tener efectos adversos en el sitio de la inyección y no acumularse en el organismo. Además, se dispensan en un único vial por lo que no requieren de procedimientos adicionales tales como mezclas o emulsiones en el momento de su utilización.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En una realización, la presente invención se relaciona con composiciones vacunales para inducir respuesta inmune contra el EGF, caracterizada porque comprende como principio activo un sistema que contiene al rhEGF o péptidos de este y una proteína o péptido transportador unidos a un núcleo constituido por nano-partículas inorgánicas biodegradables que pueden ser sales, óxidos u hidróxidos de calcio, hierro, cinc, magnesio, circonio, cerio, berilio, silicio, o la mezcla de dos o más de ellos. Preferentemente, el núcleo inorgánico es de CaP y más particularmente de tipo HAp. Esta HAp es preferiblemente amorfa o de baja cristalinidad y está recubierta parcial o totalmente por un ligando orgánico, particularmente citrato de sodio.

Adicionalmente, la proteína o péptido transportador se selecciona del grupo que comprende: la toxina B del cólera, toxoide tetánico, KLH y la P64k de *Neisseria meningitides.*

Además, el principio activo de las composiciones vacunales de la presente invención se encuentra sobre la superficie de las nano-partículas de HAp, enlazado mediante uno de los siguientes métodos:

- Unión covalente del conjugado químico del rhEGF o péptidos del mismo y de la proteína o péptido transportador con la nano-partícula de HAp (HAp-rhEGF-rP64k).
- Unión covalente del rhEGF o péptidos de mismo y de la proteína o péptido transportador con la nano-partícula de HAp de modo independiente (HAp-PI).
- Unión covalente sucesiva del rhEGF o péptidos de mismo y de la proteína o péptido transportador a la nano-partícula de HAp.
- Conjugación múltiple del rhEGF o péptidos de mismo y de la proteína o péptido transportador sobre la superficie de la HAp (HAp-CM).
- Encapsulación o unión física del rhEGF y de la proteína o péptido transportador sobre la superficie de la HAp.

Otro aspecto, contempla la combinación de las composiciones vacunales aquí descritas con adyuvantes que se seleccionan de los grupos que comprenden: adyuvantes incompletos de Freund, adyuvantes a base de escualeno, adyuvantes de origen sintético, adyuvantes de origen mineral, adyuvantes de origen vegetal, adyuvantes de origen animal, adyuvantes proteicos particulados y liposomas.

En una realización adicional, es objeto de la presente invención el uso de las composiciones vacunales aquí descritas para el tratamiento crónico del cáncer.

En otro aspecto, es objeto de la presente invención, un método de tratamiento a un sujeto que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones vacunales descritas y particularmente, con una etapa de mantenimiento de la inducción de respuesta inmunológica producida por otra composición vacunal contra el EGF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención abarca la síntesis de nano-partículas inorgánicas biodegradables, recubiertas con ligandos orgánicos, la activación química, así como la unión covalente o por interacciones electrostáticas con un antígeno que induce respuesta inmune específica contra el EGF y su construcción sobre la superficie de dicha partícula.

Obtención y activación de nano-partículas inorgánicas biodegradables

La presente invención comprende la formación de partículas inorgánicas biodegradables, con dimensiones en escala nanométrica, submicrométrica o micrométrica. Estas partículas se recubren con un ligando orgánico, preferentemente citrato de sodio y se obtienen por precipitación, aunque la presente invención no se restringe a dicho método.

Las partículas biodegradables poseen un núcleo inorgánico formado por sales, óxidos u hidróxidos de calcio, hierro, cinc, magnesio, circonio, cerio, berilio, silicio, o la mezcla de dos

o más de ellos. Preferentemente están formadas por CaP, más preferentemente de HAp amorfa, o HAp amorfa con sustituciones isomórficas de uno o más metales.

Para la formación de las partículas inorgánicas, se utilizan fuentes portadoras de iones calcio y fosfato, además un ligando orgánico que le confiera carga superficial y un grupo funcional que permita la conjugación química con biomoléculas.

Las partículas empleadas en los sistemas inmunoterapéuticos descritos en la presente invención se caracterizan por al menos una de las siguientes propiedades:

- Estar constituidas por partículas inorgánicas biodegradables que pueden tener sustituciones isomórficas de iones metálicos o de otra naturaleza.
- Estar sintetizadas preferentemente mediante vía húmeda, de preferencia por precipitación, aunque la presente invención no se restringe a este método.
- Dimensiones micrométricas, submicrométricas, nanométricas o combinaciones de estas.
- Morfología esférica, cilíndrica, de placas o combinaciones de estas, aunque el alcance de la presente invención no se restringe a dichas morfologías.
- Estar preferentemente recubiertas con un ligando orgánico que le confiera carga superficial y grupos funcionales para la conjugación de antígenos.

Para la obtención de las partículas inorgánicas comprendidas en esta invención se requiere preferentemente:

- Mantener la relación molar de catión/anión en 1-4.
- Adicionar citrato de sodio u otro ligando orgánico de efecto similar a los reactantes en proporción molar de 3-5 en relación al contenido de iones calcio.
- Ajustar el pH a 7-13, mediante la adición de un álcali, preferiblemente hidróxido de amonio o hidróxido de sodio.
- Realizar la reacción durante 1-4 h, preferentemente a temperatura ambiente (20±5ºC).
- Efectuar el proceso de secado a vacío o temperatura ambiente.

Las partículas inorgánicas obtenidas en las condiciones descritas anteriormente parcial o totalmente recubiertas con un ligando orgánico que contiene grupos carboxilatos, preferentemente citrato de sodio se activan mediante la adición de un reactivo enlazador de la familia de las carbodiimidas u otro que cumpla similares funciones. En dicho proceso se utilizan relaciones másicas reactivo/partícula de 1 a 6 mg/mg, siendo más recomendable 2 a 5 mg/mg. La suspensión se mantiene en agitación a temperatura ambiente (20±5ºC) durante 1-4 h, más recomendable 0,5-3 h. Posteriormente, las partículas activadas se purifican, preferentemente mediante procesos de centrifugación o filtración.

Mediante el procedimiento descrito anteriormente, se obtienen predominantemente partículas con tamaños ≤ 200 nm, con su superficie activada, aptas para enlazarse con proteínas que tengan grupos funcionales expuestos. Lo anterior las hace superiores a los desarrollos previos a partir de partículas inorgánicas para la encapsulación o adsorción física de principios activos.

Obtención del sistema nano-particulado para la inducción de respuesta contra el EGF

Las partículas previamente activadas, se mezclan con el conjugado químico de las proteínas recombinantes rhEGF y rP64k, a razón másica de rhEGF-rP64k/HAp 1-10 mg/mg, siendo más recomendable 2-7 mg/mg. La reacción anteriormente descrita produce un enlace covalente de tipo amida entre los grupos aminos (NH_2) del conjugado y los grupos carboxilatos (COO^-) en la superficie de la partícula. También se producen interacciones electrostáticas entre los grupos calcio remanentes de la superficie de la HAp y el conjugado rhEGF-rP64k que se encuentra cargado negativamente y posee grupos COO^- expuestos. Luego la suspensión coloidal se dispersa, preferentemente con EDTA y por último se regula su pH a valores entre 6,7 y 7,3.

En otra variante de realización, se sustituye el conjugado químico de las proteínas recombinantes rhEGF y rP64k por el conjugado de la rP64k u otra proteína transportadora con uno o varios péptidos del rhEGF.

La unión de los conjugados descritos en la presente invención con la superficie de las partículas inorgánicas mediante el procedimiento especificado anteriormente, constituye el primer sistema de este tipo para el tratamiento del cáncer, con una composición sustancialmente diferente a las formulaciones vacunales descritas en las patentes US 5,894,018 y US 8,778,879. Al ser inoculado, produce una respuesta inmune que incluye la generación de anticuerpos anti-EGF capaces de capturar al EGF circulante e impedir que este se una a su receptor en la superficie del tumor.

El sistema obtenido por la unión covalente entre el antígeno y las partículas inorgánicas es estable y puede almacenarse durante tiempos prolongados, como es requerido por una formulación parenteral. Esta cualidad, lo hace superior a sistemas inmunoterapéuticos o de liberación de medicamentos desarrollados previamente a partir de las partículas inorgánicas, por los métodos de encapsulación o adsorción de principios activos.

Conformación de conjugados sobre las partículas inorgánicas mediante uniones covalentes e interacciones electrostáticas, para la inducción de respuesta contra el EGF

La presente invención contempla otras opciones para la construcción de sistemas para la inducción de respuesta inmune contra el EGF, mediante uniones covalentes e interacciones electrostáticas entre sus componentes, las cuales se detallan a continuación:

- *Unión del rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos a las nano-partículas inorgánicas.*

Las partículas obtenidas según las metodologías descritas anteriormente, previamente activadas con una carbodiimida, preferentemente con 1-etil-3-(3-dimetiaminopropil) carbodiimida (EDC), se mezclan con una disolución de PBS de pH 7±0,3 que contiene rhEGF y rP64k en proporción molar de rhEGF/rP64k de 3 a 9 mol/mol, preferentemente entre 4 y 8 mol/mol. Además, las relaciones másicas HAp/rP64k y HAp/rhEGF utilizadas se encuentran entre 1-6 mg/mg, preferentemente entre 2-5 mg/mg. Posteriormente, se mantiene la suspensión en agitación a temperatura ambiente durante 1-4 h, más recomendable 2-3 h.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

Con este método, se obtiene un sistema en el que las proteínas rhEGF y rP64k se unen químicamente y por interacciones electrostáticas con las nano-partículas, sin estar unidas entre ellas. La partícula constituye el elemento enlazador que asegura la inmunogenicidad del sistema. En este desarrollo se evidencia que es posible producir sistemas que generan respuesta inmunológica anti-EGF sin que requiera unir químicamente al rhEGF con una proteína transportadora. Además, reduce hasta en 40% la cantidad de rhEGF necesaria para la conformación del sistema y reduce los riesgos asociados a la toxicidad del glutaraldehído empleado en las invenciones US 5,894,018 y US 8,778,879.

- *Conjugación del rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos, mediante dos pasos de reacción.*

Las nano-partículas obtenidas según las metodologías descritas anteriormente, previamente activadas con una carbodiimida, preferentemente EDC, se mezclan con una disolución de PBS de pH 7±0,3 que contiene rP64k en proporción másica de 1-6 mg/mg, preferentemente entre 2-5 mg/mg. La suspensión se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 1-4 h, preferentemente entre 2-3 h. Posteriormente se elimina el exceso de proteína rP64k, se activa preferentemente con EDC, luego se elimina el exceso de EDC y se mezcla con rhEGF en proporción de 1-10 mol de rhEGF por mol de rP64k, preferiblemente 2-6 mol de rhEGF por mol de rP64k.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la

sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

Este procedimiento genera un sistema donde la proteína transportadora se une químicamente y por interacciones electrostáticas con las nano-partículas inorgánicas biodegradables y también con el rhEGF. Este método produce un conjugado rhEGF-rP64k formado por dos capas de proteínas con alta pureza, sin la presencia de rhEGF o rP64k libres. Es superior al conjugado rhEGF-rP64k derivado de las invenciones US 5,894,018 y US 8,778,879, en los cuales se obtiene más de 40% de rhEGF en estado libre, sin relevancia biológica. Además, reduce los riesgos asociados a la toxicidad del glutaraldehido empleado en esas invenciones.

- *Conjugación múltiple del rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos sobre la superficie de la partícula inorgánica.*

Las partículas obtenidas según las metodologías descritas anteriormente, previamente activadas con una carbodiimida, preferentemente EDC, se mezclan con una disolución de PBS de pH 7±0,3 que contiene rhEGF y rP64k. Ambas proteínas reaccionan con las partículas activadas y con el exceso de EDC que se mantiene en disolución luego de la activación, uniendo las proteínas entre sí y con la superficie de la partícula. Para ello debe emplearse una relación molar de rhEGF/rP64k de 3-9 mol/mol, siendo más recomendable entre 4-8 mol/mol. Además, las relaciones másicas partícula/rP64k y partícula/rhEGF utilizadas se encuentran entre 1-6 mg/mg, siendo más recomendable entre 2-5 mg/mg. Se mantienen en agitación a temperatura ambiente durante 1-4 h, más recomendable 2-3 h.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

Se genera una matriz compleja de conjugados rhEGF-rP64k y de estos con el ligando que recubre la nano-partícula inorgánica. Al igual que los sistemas anteriores, genera respuesta inmunológica de anticuerpos anti-EGF. También reduce hasta en 40% la cantidad de rhEGF necesaria para la conformación del sistema y reduce los riesgos asociados a la toxicidad del glutaraldehido empleado en las invenciones US 5,894,018 y US 8,778,879.

Conformación de sistemas para la inducción de respuesta contra el EGF mediante encapsulación o adsorción sobre la partícula inorgánica

Si bien, los sistemas unidos químicamente y obtenidos por los procedimientos anteriores son más estables y apropiados para las formulaciones vacunales, la encapsulación y adsorción del antígeno también son útiles. Para ello, la presente invención aporta los procedimientos para sintetizar inmunógenos que poseen un núcleo inorgánico y conjugado rhEGF-rP64k o rhEGF y rP64k o sus péptidos, en su interior o adsorbidos sobre la superficie de la partícula.

- *Encapsulación del conjugado de rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos a la partícula inorgánica*:

Fuentes portadoras de iones calcio y fosfato se mezclan en disolución acuosa, asegurando mantener una relación molar de catión/anión de 1,4-3,5. Se le adiciona el conjugado rhEGF-P64k, a razón másica rhEGF-rP64k/nano-partícula inorgánica de 1-10 mg/mg, siendo más recomendable 2-7 mg/mg. Posteriormente, se añade hidróxido de amonio o hidróxido de sodio hasta obtener un pH 8-10 y se mantiene la reacción en agitación durante 1-4 h a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, preferentemente se lava con agua purificada y se separa por filtración. Este procedimiento genera nano y micropartículas que contienen en su interior y sobre la superficie conjugados rhEGF-rP64k unidos por interacciones entre los grupos cargados positivamente de la partícula y los COO^- del conjugado y entre los grupos cargados negativamente en la partícula y los aminos del conjugado.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

- *Encapsulación del rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos a la partícula inorgánica:*

Procedimiento similar al descrito anteriormente, difiriendo en que se añade a la disolución rhEGF y rP64k en lugar de conjugado rhEGF-rP64k, en proporción de 1-10 mg/mg de proteínas totales, siendo más recomendable 2-7 mg/mg. Se mantiene en este proceso una relación de 1-10 mol de rhEGF por mol de rP64k, siendo más recomendable 2-5 mol de rhEGF por mol de rP64k. Una vez finalizada la reacción, preferentemente se lava con agua purificada y separa por filtración. Este procedimiento genera nano y micro-partículas que contienen en su interior y sobre la superficie conjugados rhEGF-rP64k unidos por

interacciones electrostáticas entre los grupos cargados positivamente en la partícula y los COO^- del conjugado y entre los grupos cargados negativamente en la partícula y los aminos del conjugado.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

- *Adsorción del conjugado de rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos sobre la partícula inorgánica:*

Se parte de partículas previamente recubiertas con citrato de sodio, descritas anteriormente. Se mezclan con una disolución de PBS de pH 7±0,3 que contiene conjugado rhEGF-rP64k en proporción másica de 1-10 mg/mg, siendo más recomendable 2-7 mg/mg. Se mantienen en agitación a temperatura ambiente durante 1-4 h, más recomendable 2-3 h. El sistema resultante de este procedimiento es predominantemente nano-particulado con tamaños menores de 200 nm. El conjugado rhEGF-rP64k se une por interacciones electrostáticas entre los grupos cargados positivamente en la superficie de la nano-partícula y los COO^- del conjugado y entre los grupos COO^- del citrato y los grupos amino del conjugado.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

- *Adsorción del rhEGF o péptidos de éste y de una proteína transportadora o sus péptidos a la partícula inorgánica:*

Se realiza un procedimiento similar al descrito en la variante anterior, difiriendo en que se añade a la disolución rhEGF y rP64k, en lugar de conjugado rhEGF-rP64k, en proporciones 1-10 mg/mg de proteínas totales, siendo más recomendable 2-7 mg/mg. Este proceso requiere de una relación de 1-10 mol de rhEGF por mol de rP64k, siendo más recomendable 2-5 mol de rhEGF por mol de rP64k. El procedimiento genera nano y micropartículas que contienen sobre la superficie moléculas de rhEGF y rP64k unidas por interacciones entre los grupos cargados positivamente en la partícula y los COO^- de las proteínas y entre los grupos cargados negativamente en la partícula y los grupos amino de las proteínas.

En otras variantes de realización la proteína recombinante rP64k se sustituye por toxoide tetánico, KLH u otra proteína transportadora. La presente invención también comprende la sustitución de la proteína rP64k por uno o varios péptidos inmunogénicos de origen natural o sintético.

En otra variante de realización se sustituye el rhEGF por uno o varios péptidos que forman parte del rhEGF.

Los novedosos sistemas particulados descritos anteriormente están formados sobre un núcleo inorgánico biodegradable. Este se encuentra unidos a antígenos autólogos, preferentemente conjugados químicos de las proteínas recombinantes rhEGF y rP64k o a dichas proteínas o sus péptidos por separado. Se sustentan por enlaces covalentes de tipo amida, encapsulación o adsorción sobre la superficie de la nano-partícula. Constituyen la base de formulaciones vacunales para el tratamiento del cáncer, administradas por vía parenteral luego de dispersarse con EDTA y ajustarse apropiadamente a pH 7±0,3.

Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

Las formulaciones farmacéuticas derivadas de la presente invención son útiles para el tratamiento del cáncer en tejidos de origen epitelial, ejemplo de ellos son el cáncer de células epiteliales escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no-pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer hepatocelular, gástrico, gastrointestinal, páncreas, glioblastoma, cervical, ovario, hígado, vejiga, mama, colon, recto, cáncer colorectal, cabeza y cuello, útero, carcinoma de glándulas salivales, riñón, próstata, vulva, tiroides, carcinoma anal y carcinoma del pene.

Pueden utilizarse de modo independiente o en combinación con adyuvantes, lo que potencia o complementa su respuesta de anticuerpos anti-EGF.

Particularmente, es objeto de esta invención la combinación de sistemas nano-particulados inorgánicos biodegradables ligados a las proteínas rhEGF-rP64k, con adyuvantes oleosos tales como los incompletos de Freund o a base de escualeno, de origen sintético, mineral, vegetal o animal, así como proteicos particulados, liposomas u otros adyuvantes o sistemas capaces de generar o potenciar respuestas de tipo humoral o celular, o la combinación de estos. Los sistemas descritos anteriormente son eficaces en el mantenimiento de la respuesta inmunológica anti-EGF, con previa inducción de anticuerpos generados por el sistema descrito en la invención US 8,778,879, o con otro sistema que proporcione resultados similares.

Las combinaciones descritas anteriormente favorecen el tratamiento crónico del cáncer en tejidos de origen epitelial, ya que evitan la acumulación de sustancias ajenas al organismo en los sitios de inyección y su toxicidad asociada.

Los sistemas anti-EGF comprendidos en la presente invención utilizan excipientes farmacéuticos adecuados. Entre ellos incluyen, aunque no se limitan a: agua para inyección, cloruro de sodio, sales de fósforo y potasio, cloruro de calcio, citrato e hidróxido de sodio y EDTA. Pueden inocularse a pacientes con cáncer de origen epitelial en formulaciones parenterales de concentraciones de proteínas de 0,5 a 5 mg/mL y dosis comprendidas entre 20-70 µL/kg o 20-70 µg de proteínas totales por kilogramo o hasta 5 mg de proteínas totales, siendo más recomendable 30-60 µg/kg. La dosis a aplicar del componente inorgánico definido en la presente invención, será de 2-4,5 mg/kg, siendo más recomendado de 3-4 mg/kg, siempre que esta se mantenga dentro de los límites de las dosis aprobadas para su uso en humanos, por vía intramuscular o subcutánea.

La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Patrón de Difracción de Rayos X: A) Partículas de HAp amorfas, obtenidas en la presente invención. B) Patrón de referencia de HAp JCPDS: PDF Ref. 09-0432.

Figura 2. Espectro FT-IR: A) Partículas de HAp amorfas, obtenidas en la presente invención. B) citrato de sodio.

Figura 3. Tamaño de las partículas de HAp amorfas obtenidas en la presente invención, determinado por microscopía electrónica de transmisión. A) Imagen de las partículas con magnificación de 25000 X. B) Imagen de las partículas con magnificación de 500000 X. C) Distribución de tamaño de las partículas.

Figura 4. Termograma de las nano-partículas de HAp amorfas, obtenidas en la presente invención.

Figura 5. Distribución de tamaño del sistema HAp-rhEGF-rP64k enlazados de forma covalente, determinado por el método de dispersión de la luz dinámica (DLS).

Figura 6. Caracterización del sistema HAp-rhEGF-rP64k mediante: A) electroforesis SDS-PAGE: 1-Patrón de masas moleculares, 2-Control positivo de conjugado rhEGF-rP64k elaborado según la invención US 8,778,879, 3- Sistema HAp-rhEGF-rP64k. B) Perfil de Western Blot: 1- Control positivo de conjugado rhEGF-rP64k, 2- Sistema HAp-rhEGF-rP64k.

Figura 7. Respuesta de anticuerpos anti-EGF en ratones C57BL/6 inmunizados con el sistema HAp-rhEGF-rP64k enlazados de forma covalente y con el grupo de control (Montanide-rhEGF-rP64k).

Figura 8. Relación de subclases de anticuerpos (IgG2b + IgG2c)/IgG1, contenidos en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con los sistemas HAp-rhEGF-rP64k y con el grupo de control (Montanide-rhEGF-rP64k).

Figura 9. Fotografía del efecto de los sistemas HAp-rhEGF-rP64k y del Montanide-rhEGF-rP64k sobre los sitios de inyección en ratones BALB/c. A) Efecto del sistema Montanide-rhEGF-rP64k. B) Efecto del sistema HAp-rhEGF-rP64k.

Figura 10. Respuesta de anticuerpos anti-EGF en ratones C57BL/6 inmunizados con el sistema HAp-rhEGF-rP64k combinado con VSSP y con rhEGF-rP64k encapsulado en liposomas DRV's.

Figura 11. Relación de subclases de anticuerpos (IgG2a + IgG2b)/IgG1, contenidos en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con el sistema HAp-rhEGF-rP64k combinado con VSSP y con rhEGF-rP64k encapsulado en liposomas DRV's.

Figura 12. Mantenimiento de la respuesta de anticuerpos anti-EGF por el sistema HAp-rhEGF-rP64k, con previa inducción de una o dos dosis con el sistema Montanide-rhEGF-rP64k.

Figura 13. Distribución de tamaño del sistema HAp-PI construido sobre la partícula, determinado por DLS.

Figura 14. Caracterización del sistema HAp-PI mediante: A) electroforesis SDS-PAGE: 1-Patrón de masas moleculares, 2-Control positivo de rP64k 3- Control positivo de rhEGF 4-Sistema HAp-PI enlazados de forma covalente y B) Perfil de Western Blot: 1- Control positivo de rP64k, 2- Sistema HAp-PI.

Figura 15. Distribución de tamaño del sistema HAp-CM.

Figura 16. Caracterización del sistema HAp-CM mediante: A) electroforesis SDS-PAGE 1-Patrón de masas moleculares, 2-Control positivo de conjugado rhEGF-rP64k elaborado según la invención US 8,778,879, 3- Sistema HAp-CM enlazados de forma covalente y B) Perfil de Western Blot 1- Control positivo de conjugado rhEGF-rP64k, 2- Sistema HAp-CM.

Figura 17. Respuesta de anticuerpos anti-EGF en ratones C57BL/6 inmunizados con los sistemas HAp-rhEGF-rP64k, HAp-PI y HAp-CM.

Figura 18. Relación de subclases de anticuerpos (IgG2b + IgG2c)/IgG1, contenidos en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con los sistemas HAp-rhEGF-rP64k, HAp-PI y HAp-CM y con el control Montanide-rhEGF-rP64k.

Figura 19. Imágenes fotográficas de los cortes histológicos de tejido muscular extraídos del sitio de inoculación y tejido muscular adyacente de los ratones C57BL/6, con magnificación 10X. Se representa con ★ al tejido de reparación fibroblástica. Los ratones fueron tratados con: A-C: Montanide-rhEGF-rP64k, D: HAp-rhEGF-rP64k, E: HAp-CM, F: HAp-PI.

Figura 20. Número de lesiones observadas en los tejidos de los sitios de inyección de ratones C57BL/6 inmunizados con los sistemas HAp-rhEGF-rP64k, HAp-PI y HAp-CM y con el control Montanide-rhEGF-rP64k.

EJEMPLOS

Ejemplo No. 1. Síntesis, caracterización y activación de nano-partículas de HAp

Siguiendo una variante modificada del procedimiento descrito por Koroleva M.y cols. Rusian Journal of inorganic chemistry (2016), 61(6): 674-680), se obtuvo nano-partículas de HAp amorfas recubiertas con citrato de sodio. Bajo condiciones ambientales controladas se preparó una disolución A, formada por $CaCl_2$ 0,05 mol/L y citrato de sodio, con relación molar: citrato de sodio/calcio de 4:1. A continuación, se adicionó una disolución B estéril, formada por NaH_2PO_4 0,06 mol/L a flujo de 1 mL/min, manteniendo una relación molar Ca/P=1,67. Posteriormente, se ajustó a pH 10 con una disolución de hidróxido de sodio y se mantuvo la reacción en agitación durante tres horas a temperatura ambiente. Una vez concluida la reacción se lavó con agua purificada y separó por filtración en Amicon utilizando membrana de polietersulfona de tamaño de poro 10 kDa. El sólido obtenido se secó al vacío y temperatura ambiente. Antes de su utilización, fueron esterilizadas con vapor puro a 120ºC durante 30 min y secadas al vacío.

Mediante un ensayo de Difracción de Rayos X se comprobó que se generaron nano-partículas de HAp amorfa (Figura 1), con grado de cristalinidad de 9.3% y tamaño de cristalita de 16,5 nm. En dicho ensayo se empleó radiación de cobre (Cu Kα) con un tubo de 45 kV y 40 mA. El rango fue de 10º a 90º con pasos de 0,013º en intervalos de nueve segundos.

Los espectros infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR por sus siglas en idioma ingles) de las nano-partículas (A) y del citrato de sodio utilizado como control (B) se muestra en la Figura 2. Las bandas observadas en 1090, 1030, 962, 604, 561 y 472 cm^{-1} en el espectro de las nano-partículas confirmaron la presencia de los grupos fosfatos correspondientes a la HAp. Además en 3400 cm^{-1} se encuentra una banda ancha atribuida a agua residual y a los grupos OH^-. También se observaron las bandas de los grupos carboxilatos del citrato en 1610 y 1413 cm^{-1} en ambos espectros, lo que confirma la presencia de este ligando sobre la superficie.

Las nano-partículas mostraron una morfología esférica (Figuras 3A y 3B), con un tamaño promedio de 62±13 nm (Figura 3C), determinado por Microscopia electrónica de trasmisión. En el termograma se encontró la pérdida de 6,2% de la masa a temperaturas mayores de 200ºC (Figura 4), lo que se encuentra relacionado con la presencia de citrato de sodio sobre la superficie de las nano-partículas. El rango de temperaturas analizado fue entre 25ºC y

1000ºC con una velocidad de calentamiento de 20 K/min, empleando un flujo de argón de 60 mL/min.

Las nano-partículas de HAp amorfa se trataron con una disolución estéril de EDC manteniendo una relación másica EDC/HAp de 2:1 durante una hora, bajo condiciones ambientales controladas. Luego se centrifugó la suspensión a 6708 gravedades y se eliminó el exceso de EDC.

Ejemplo 2. Obtención del sistema HAp-rhEGF-rP64k por unión covalente de las nano-partículas de HAp amorfa al conjugado rhEGF-rP64k

Las nano-partículas de HAp amorfas obtenidas y activadas según el Ejemplo 1 se mezclaron bajo condiciones ambientales controladas, con una disolución estéril de tampón fosfato (PBS) de pH 7±0,3, que contenía el conjugado químico rhEGF-rP64k obtenido según la metodología descrita en la invención US 8,778,879, a razón másica rhEGF-rP64k/HAp de 1: 2,5 La suspensión formada se mantuvo en agitación en zaranda a 140 ciclos por minuto, durante 2 h a temperatura ambiente.

Se obtuvo el sistema HAp-rhEGF-rP64k que se dispersó con EDTA, se ajustaron las condiciones del medio a pH a 7±0,3 y concentración de proteínas a 1±0,2 mg/mL, con disoluciones estériles de PBS e hidróxido de sodio.

El ensayo de DLS indicó la presencia de nano-partículas de diámetro hidrodinámico medio 97,5 nm, con índice de polidispersión de 0,36. El sistema obtenido fue polidisperso con diámetro de partículas de 9 a 366 nm, medidos por intensidad (Figura 5).

El sistema nano-particulado, obtenido mediante el procedimiento explicado anteriormente, fue caracterizado por electroforesis SDS-PAGE y Western Blot (Figura 6). La electroforesis mostró un patrón de bandas similar al control positivo del conjugado rhEGF-rP64k (bandas predominantes con masa molecular igual o superior a 66 kDa), lo que indica su presencia en el sistema. En el ensayo de Western Blot se observó una banda similar al control de conjugado rhEGF-rP64k libre, determinándose la existencia de rhEGF en conjugados de masa molecular mayor de 200 kDa. Con este análisis se demostró que el conjugado rhEGF-rP64k unido a las nano-partículas mantuvo su integridad estructural y funcional pues continúa siendo reconocido por los anticuerpos anti-EGF.

Ejemplo 3. El sistema HAp-rhEGF-rP64k genera respuesta de tipo humoral contra el EGF sin efectos adversos visibles en los sitios de inyección

Se inmunizaron ratones C57BL/6 (n=5) con 63 µg de proteínas, contenido en el sistema descrito en el Ejemplo 2. Como control positivo del ensayo se usó un lote de producto obtenido según la metodología descrita en la invención US 8,778,879 (Montanide-rhEGF-rP64k). Se aplicó un esquema de inmunización de cuatro dosis (días: 0, 14, 28 y 42).

Dos días antes de iniciar el protocolo de inmunización y en los días 35 y 56, a ambos grupos de ratones se les determinaron los títulos de anticuerpos de tipo IgG total contra el EGF mediante ELISA. Se determinó además la relación (IgG2b + IgG2c)/IgG1 específicas al EGF en sueros inmunes a los 56 días. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis, letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

El sistema HAp-rhEGF-rP64k generó anticuerpos anti-EGF, que fueron determinados en el suero inmune en dilución de 1/10000 a los 56 días (Figura 7). Este resultado demuestra que la unión del conjugado rhEGF-rP64k a la partícula no afecta su integridad, y que el HAp potencia una respuesta humoral anti-EGF a pesar de ser significativamente menor que el grupo control. Por su parte, la relación (IgG2b + IgG2c)/IgG1 mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta producida por el sistema HAp-rhEGF-rP64k y el control (Montanide-rhEGF-rP64k) (Figura 8). En ambos sistemas prevalecen respuestas de tipo humoral (Th2), lo que los hace muy apropiadas para la depleción del EGF, como parte del tratamiento del cáncer de origen epitelial.

Se determinó el efecto del sistema HAp-rhEGF-rP64k sobre el sitio de inyección. Para ello se trataron cinco ratones BALB/c con el sistema anti-EGF obtenido en el Ejemplo 2 (HaP-rhEGF-rP64k) e igual cantidad de ratones con el control Montanide-rhEGF-rP64k. El esquema de vacunación fue similar al descrito anteriormente. Al concluir el experimento, se tomaron imágenes fotográficas a los sitios de inyección en los ratones de los dos grupos tratados. En la Figura 9A se aprecia que los ratones del grupo de control, presentaron acumulaciones del aceite mineral en los sitios de inyección, provenientes del Montanide. Sin embargo, en los ratones tratados con el sistema HAp-rhEGF-rP64k producido según el Ejemplo 2 (Figura 9B), no se apreciaron afectaciones en los sitios de inyección. Estos resultados indican que el nuevo sistema desarrollado en la presente invención reduce sustancialmente el efecto sobre el sitio de inyección, y su potencialidad de utilizarlo en el tratamiento crónico del cáncer, mediante su inoculación periódica durante varios años.

Ejemplo 4. La combinación del sistema HAp-rhEGF-rP64k con adyuvantes particulados genera respuesta de anticuerpos IgG anti-EGF e induce un patrón de respuesta de tipo Th1

Se emplearon ratones C57BL/6 que se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno y se inmunizaron de la siguiente manera:

Grupo 1: 63 µg de proteínas de la composición vacunal descrita en US 8,778,879 (Montanide-rhEGF-rhP64k) (Control positivo).

Grupo 2: 63 µg de proteínas del sistema HAp-rhEGF-rP64k con 100 µg de proteínas del adyuvante nano-particulado VSSP.

Grupo 3: 31,5 µg de proteínas del sistema HAp-rhEGF-rP64k y 31,5 µg de conjugado rhEGF-rP64k, encapsulado en vesículas liposomales (DRV´s) obtenidas por la metodología deshidratación-rehidratación (Kirby y Gregoriadis, Biotechnology, (1984) 2: 979-984).

Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14, 28 y 42. Se realizó extracción de sangre dos días antes de iniciar el protocolo y en los días 35 y 56 y con el suero obtenido se determinó mediante ELISA los títulos de anticuerpos IgG totales anti-EGF. Se determinó además la relación (IgG2b + IgG2c)/IgG1 específicas al EGF en los sueros el día 56. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis, letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Se evidenció generación de anticuerpos anti-EGF en los tres grupos estudiados. Las combinaciones del sistema HAp-rhEGF-rP64k con VSSP y con liposomas DRV´s produjeron anticuerpos que fueron determinados en el suero inmune hasta una dilución de 1/10000 y resultaron similares durante las dos extracciones (Figura 10). Se demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas de la combinación, con respecto al control.

El análisis de la relación (IgG2b + IgG2c)/IgG1 a los 56 días, mostró respuestas similares de ambas combinaciones de adyuvantes, siendo estadísticamente superiores al control (Figura 11). Estos resultados evidencian que la combinación de formulaciones a base de HAp con otros adyuvantes particulados, potencia una respuesta inmune específica al EGF que induce un patrón de respuesta Th1 superior, siendo este patrón el más favorable para los tratamientos dirigidos contra el cáncer.

Ejemplo 5. Mantenimiento de respuesta de anticuerpos IgG anti-EGF por el sistema HAp-rhEGF-rP64k, previamente inducida con Montanide-rhEGF-rP64k

Se emplearon tres grupos de ratones C57BL/6 (n=5) a los que se les inmunizó los días: 0, 14, 28, 42 y 70, siguiendo los siguientes esquemas de inmunización:

Grupo 1 (Control): Se inmunizó a los ratones con 63 µg de proteínas contenidas en el sistema descrito en la invención US 8,778,879 (Montanide-rhEGF-rhP64k).

Grupo 2: Se inmunizó a los ratones el día 0 con 63 µg de proteínas contenidas en el sistema Montanide-rhEGF-rhP64k y el resto de las inmunizaciones con igual cantidad de proteínas contenidas en el sistema HAp-rhEGF-rP64k.

Grupo 3: Se inmunizó a los ratones los días 0 y 14 con 63 µg de proteínas contenidas en el sistema Montanide-rhEGF-rhP64k y el resto de las inmunizaciones con igual cantidad de proteínas contenidas en el sistema HAp-rhEGF-rP64k.

Dos días previos a la primera inmunización se extrajo el suero preinmune y a los 35, 56 y 84 días se realizaron extracciones de los sueros inmunes y se cuantificó los títulos de anticuerpos IgG anti-EGF mediante ELISA.

Se observaron títulos de anticuerpos anti-EGF a los tres tiempos estudiados, sin diferencias estadísticas entre los tres grupos, observándose en la dilución de 1/50000 el día 35 y 1/100000 los días 56 y 84 (Figura 12). La inoculación del sistema HAp-rhEGF-rP64k mantuvo la respuesta de anticuerpos anti-EGF de tipo IgG inducida por el Montanide-rhEGF-rP64k, durante todo el período de tiempo estudiado. Ello sustenta la factibilidad de sustituir el Montanide por HAp como adyuvante del conjugado rhEGF-rP64k en la fase de mantenimiento de la respuesta inmune anti-EGF y su aplicación en el tratamiento crónico del cáncer de origen epitelial.

Ejemplo 6. Construcción del sistema HAp-PI mediante unión covalente de las proteínas rhEGF y rP64k sobre la superficie de las nano-partículas de HAp amorfa

Las nano-partículas de HAp previamente recubiertas con citrato de sodio y activadas con EDC, obtenidas según la metodología descrita en el Ejemplo 1 se mezclaron bajo condiciones ambientales controladas con una disolución estéril de PBS de pH 7±0,3 que contenía rhEGF y rP64k en proporción de 6 mol de rhEGF por mol de rP64k y razón másica proteínas/HAp de 1: 2,5. Se mantuvo la suspensión en agitación a 140 ciclos por minuto y temperatura ambiente durante 2 h. Mediante este procedimiento se obtuvo un sistema rhEGF-HAp-rP64k que se distingue por estar unidas las proteínas a la nano-partícula de HAp pero no entre sí. Dicho sistema fue dispersado con EDTA, ajustado el pH a 7±0,3 y su concentración de proteínas a 1±0,2 mg/mL.

En la Figura 13 se aprecia el perfil de tamaño de partículas medido por DLS. El diámetro medio fue de 111,2 nm, con un índice de polidispersión de 0,347. El sistema obtenido fue similar al generado en el Ejemplo 2 en cuanto a su tamaño, polidispersión y perfiles DLS. Lo anterior indica que la unión del rhEGF y la rP64k a las nano-partículas de HAp sin estar ligadas entre sí, produjeron una dispersión similar a la obtenida con el conjugado rhEGF-rP64k.

En la Figura 14A del ensayo de SDS-PAGE se observa que en el carril correspondiente al sistema HAp-PI aparece una banda principal a la altura de 66 kDa, característica de la proteína rP64k y otra banda a similar altura de corrida que el control de rhEGF (6 kDa). Estos resultados demostraron que ambas proteínas recombinantes se encontraban unidas a la nano-partícula de HAp y que al ser reducidas mantuvieron su masa molecular característica debido a que no están unidas entre sí.

La Figura 14B evidenció la presencia de una banda aproximadamente a la altura de 66 kDa en los carriles 1 y 2, lo que indica la existencia de la proteína rP64k en el sistema HAp-PI y que esta mantuvo su integridad cuando se une a las nano-partículas de HAp.

Ejemplo 7. Construcción del sistema HAp-CM sobre la superficie de las nano-partículas de HAp amorfa mediante conjugación múltiple de las proteínas rhEGF y rP64k

Las nano-partículas de HAp amorfa obtenidas en el Ejemplo 1 se trataron bajo condiciones ambientales controladas durante 1 h con una solución de EDC estéril, manteniendo una relación másica EDC/HAp=2,7. A continuación se añadió una solución estéril de PBS de pH 7±0,3 que contenía rhEGF y rP64k en proporción de 6 mol de rhEGF por mol de rP64k y razón másica proteínas/HAp de 1: 2,5. Se mantuvo la suspensión en agitación a 140 ciclos por minuto y temperatura ambiente durante 2 h.

Como resultado de este procedimiento, se obtuvo un sistema formado por nano-partículas de HAp recubiertas por ambas proteínas recombinantes unidas entre sí y con las nano-partículas. Dicho sistema fue dispersado con EDTA y ajustado el pH a 7±0,3. Posteriormente se diluyó con tampón PBS hasta la concentración de proteínas de 1±0,2 mg/mL.

Mediante la conjugación múltiple descrita anteriormente se obtuvo un sistema complejo HAp-rhEGF-rP64k con tamaño promedio de 90,2 nm medido por DLS, con índice de polidispersión de 0,337 (Figura 15).

Las caracterizaciones por electroforesis SDS-PAGE y Western Blot mostraron la conjugación de las proteínas, obteniéndose un producto similar al control positivo de rhEGF-rP64k, que reconoce los anticuerpos anti-EGF (Figura 16).

Ejemplo 8. Los nuevos sistemas construidos sobre las nano-partículas de HAp generan respuestas de anticuerpos IgG anti-EGF produciendo menor cantidad de lesiones epidérmicas en el sitio de inyección

Se inmunizaron tres grupos de cinco ratones C57BL/6 cada uno, con 63 µg de proteínas, contenidas en los siguientes sistemas:

Grupo 1: Sistema HAp-rhEGF-rhP64k, obtenido según la metodología del Ejemplo 2.

Grupo 2: Sistema HAp-PI, obtenido según la metodología del Ejemplo 6.

Grupo 3: Sistema HAp-CM, obtenido según la metodología del Ejemplo 7.

Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14, 28 y 42. Se realizó extracción de sangre dos días antes de iniciar el protocolo y en los días 35 y 56 y con el suero obtenido se determinó mediante ELISA los títulos de anticuerpos IgG totales anti-EGF. Se determinó además la relación (IgG2b+IgG2c)/IgG1 específicas al EGF en los sueros el día 56. El

análisis estadístico se realizó mediante la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis, letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Los sistemas HAp-rP64k y HAp-CM generaron anticuerpos anti-EGF que fueron determinados en el suero inmune hasta una dilución de 1/10000 y en el sistema HAp-PI hasta dilución de 1/8000 en los días 35 y 56 (Figura 17). Se confirmaron los resultados obtenidos por SDS-PAGE y Western Blot, (Ejemplos 6 y 7) y se demostró que los sistemas construidos sobre las nano-partículas de HAp son inmunogénicos, a pesar de que el rhEGF está en el contexto de una unión covalente con la rhP64k y la partícula de HAp. Este desarrollo, constituye una evidencia de que es factible producir sistemas que generen respuesta inmune anti-EGF sin que se requiera unir químicamente al rhEGF con una proteína transportadora.

El análisis de la relación (IgG2b+IgG2c)/IgG1 mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta producida por ellos, prevaleciendo respuestas de tipo humoral (Th2), lo que los hace apropiados para la depleción del EGF, como parte del tratamiento del cáncer de origen epitelial (Figura 18).

Pasados 120 días de iniciado el experimento, se sacrificaron los ratones C57BL/6 y se extrajeron muestras de tejido de los sitios de inyección para análisis anatomopatológico, con previa tinción con hematoxilina-eosina. Los fragmentos de tejidos se fijaron en formol neutro tamponado y se procesaron por el método de inclusión en parafina. En la Figura 19A-C, correspondientes al grupo de control (Montanide-rhEGF-rP64k) se apreció pérdida de la estructura normal del tejido muscular en el sitio de inoculación. La zona A está caracterizada por infiltrado inflamatorio y vasos sanguíneos dilatados con discontinuidad del tejido muscular adyacente. Las Figuras 19B y C, presentan fibras longitudinales (B) y transversales (C) de tejido muscular adyacentes al sitio de inoculación con invasión de una reacción de tejido de reparación fibroblástica. Sin embargo, en las Figuras 19D-F, pertenecientes a ratones tratados con los nuevos sistemas objeto de la presente invención, se observa estructura normal del sitio de inoculación y de su tejido muscular adyacente. D: HAp-rhEGF-rP64k. E: HAp-CM. F: HAp-PI.

A cada ratón de los cuatro grupos anteriores, se evaluó la presencia o no de las siguientes lesiones:

- Discontinuidad de la epidermis e infiltrado linfocitario en la dermis.
- Infiltrado inflamatorio.
- Invasión del tejido muscular.
- Degeneración vacuolar en células epiteliales.
- Vasos sanguíneos dilatados.

Por cada lesión se asignó un punto, se sumaron los valores de cada ratón en los grupos y se graficó el resultado.

El estudio evidenció que en los grupos correspondientes a los sistemas desarrollados en la presente invención se manifestaron muy limitadas cantidades de lesiones, contrario a lo observado en el grupo de control inoculado con el sistema Montanide-rhEGF-rP64k (Figura 20). Este resultado confirma las observaciones visuales del Ejemplo 3.

Estos resultados corroboran la baja toxicidad de los sistemas anti-EGF basados en nano-partículas de HAp y los efectos adversos que produce el aceite mineral contenido en el sistema Montanide-rhEGF-rP64k.