

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 538**

51 Int. Cl.:

B01J 20/28 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
B01J 20/04 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01)
B01J 20/30 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2014** **PCT/FR2014/050478**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014** **WO14184453**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2014** **E 14719037 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020** **EP 2996801**

54 Título: **Composición a base de hidroxiapatita en polvo para el tratamiento del linfoma B o T**

30 Prioridad:

15.05.2013 FR 1354361

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

21.04.2021

73 Titular/es:

URODELIA (100.0%)
Lieudit Le Gaillard Route de Saint Thomas
31470 Saiguede, FR

72 Inventor/es:

ROUQUET, NICOLE y
FRAYSSINET, PATRICK

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 820 538 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

Composición a base de hidroxiapatita en polvo para el tratamiento del linfoma B o T

5 Sector de la técnica

El campo de la invención es el de los tratamientos de inmunoterapia, en particular los tratamientos contra el cáncer.

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

10 Más precisamente aún, la invención se refiere a medios de lucha en particular contra el cáncer, que comprenden fármacos antitumorales, preferiblemente vacunas, obtenidos a partir de los antígenos tumorales de los pacientes.

15 La presente invención se refiere en particular a un medicamento, por ejemplo una vacuna tumoral, a base de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico.

También se describe un proceso para la preparación de un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico para su uso como medicamento, un proceso para la preparación del medicamento a base de polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico así como un kit de tratamiento que comprende el polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico.

20 Estado de la técnica

Es bien sabido que existen varias formas de tratamiento del cáncer mediante inmunoterapia:

- 25 • *administración de sustancias farmacológicas* (como interleucina, interferón) que aumentan la respuesta inmunitaria de forma inespecífica. Estas terapias tienen diversos grados de toxicidad y, aunque pueden mostrar cierta eficacia, muchos pacientes tratados de esta forma responden mal. Estas terapias provocan una amplificación de numerosas funciones inmunitarias;
- 30 • *el uso de anticuerpos específicos contra antígenos tumorales presentes en la superficie de las células tumorales*. Estos anticuerpos generalmente son anticuerpos híbridos humanizados. Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos es limitada debido a la variabilidad antigénica de las células tumorales ya que ciertas células tumorales en el momento del diagnóstico expresan los antígenos de interés y otras no;
- *estimulación de las células T*. Esta forma de terapia está relacionada con el objeto de la invención. La estimulación de células T puede ser:
 - 35 - adoptiva (eliminación de células T antitumorales, aumento *in vitro* de su número y posteriormente administración al paciente), o
 - activa (contacto *in vitro* o *in vivo* de antígenos tumorales con macrófagos o células relacionadas de modo que las células presentadoras de antígeno (APC) estimulen los linfocitos T). Estos agentes estimulantes de células T pueden compararse con vacunas terapéuticas.

40 Existen varias estrategias para generar vacunas estimulantes del sistema T en forma activa y específica. Una de estas estrategias de inmunoterapia se basa en el uso de proteínas de choque térmico como adyuvante. La función de un adyuvante es hacer reaccionar el sistema inmunológico a una molécula a la que no necesariamente reaccionaría o al menos no a las dosis utilizadas. Desencadena una reacción al cuerpo extraño que lleva una gran cantidad de células presentadoras de antígeno (APC) al lugar de la inyección que posteriormente informará a las líneas de linfocitos de las moléculas que deben identificar y eliminar. Esta información se obtiene mediante la exposición de las moléculas contra las cuales inmunizarse en la superficie de las APC y mediante la síntesis por estas de diversas citocinas e interleucinas, así como cofactores de membrana. Así, para generar vacunas que estimulan el sistema T a través de proteínas de choque térmico como adyuvante, se extraen del tumor proteínas de choque térmico (HSP) como la gp 96 o la HSP 70. Estas proteínas son chaperonas y se asocian con numerosos péptidos, incluidos péptidos (antígenos) específicos del tumor de cada paciente. Constituyen así una huella molecular del tumor a erradicar y difieren de un paciente a otro y de un tumor a otro. Para el mismo paciente, también varía durante el desarrollo del tumor debido a la inestabilidad genética de las células cancerosas.

55 Esta estrategia requiere purificar las proteínas vacunantes de cada tumor contra las que deben inmunizar al paciente. El protocolo de purificación es largo, difícil de industrializar y está sujeto a múltiples contaminaciones por endotoxinas. Es convencional purificar las HSP a partir de un material triturado de tumores que se somete a una serie de etapas de centrifugación, precipitación, cromatografía en Con A, análisis electroforético y cromatografía en Mono Q FPLC.

60 Las patentes n.º 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 utilizar columnas cromatográficas de Con A SEPHAROSE. Sin embargo, estos métodos pueden mejorarse.

65 Además, a partir del trabajo de Tizelius en 1973, se ha sabido que las partículas de hidroxiapatita (HAP) pueden usarse para purificar proteínas a partir de soluciones complejas. Los polvos de HAP se utilizan como lecho fijo en

columnas de cromatografía a través de las cuales se filtra la solución que contiene la molécula o moléculas a purificar. Estas moléculas se adhieren a la superficie de las partículas de polvo de HAP, de donde se desorben utilizando diversas concentraciones de soluciones salinas como tampones de fosfato o cloruro de sodio, o calcio que permite separar las diferentes moléculas de la solución por gradientes de tampones de fosfato u otros.

5 La solicitud de patente WO 2006/122914 describe la capacidad de estas partículas de HAP para purificar proteínas de choque térmico de extractos de tejido. Como se ha indicado anteriormente, la purificación de proteínas de choque térmico de una biopsia de tumor proporciona péptidos y proteínas específicos para el tumor. Estos péptidos y proteínas varían no solo de un paciente a otro, sino también durante el desarrollo del tumor en el mismo individuo
10 debido a la inestabilidad genética de la célula cancerosa. El documento WO 2006/122914 más en particular describe un proceso para la preparación en una sola etapa de antígenos tumorales destinados a ponerlos en una forma reconocible por el sistema inmunológico para poder aplicarlos a gran escala por personal no cualificado como bioquímico. También se sabe a partir de esta solicitud de patente internacional que los polvos de HAP y otras sales de calcio también se pueden utilizar como adyuvantes de vacunación y que el polvo de hidroxiapatita que tiene
15 antígenos tumorales específicos adsorbidos del tumor se puede utilizar como medicamento contra dicho tumor. El artículo de Ciocca et al., "A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patient", Cell stress & chaperones vol.12, n.º 1 (2007), páginas 33-43 también desvela la purificación de antígenos tumorales específicos del tumor por absorción en un polvo de hidroxiapatita que posteriormente se usa como fármaco contra dicho tumor.

20 Por tanto, el mismo polvo de HAP se puede utilizar tanto para purificar proteínas específicas de tumores como para estimular el sistema inmunológico contra ellas cuando se inyectan juntos polvos y proteínas. Sin embargo, los procesos para preparar polvos de HAP y los propios polvos pueden mejorarse.

25 El uso de polvos para este propósito presenta muchas limitaciones.

Los polvos deben tener una gran superficie específica para poder fijar una gran cantidad de proteínas.

30 Deben tener una alta fluidez para poder inyectarse con agujas de inyección y deben tener la resistencia suficiente para no obstruir las columnas de cromatografía. Además, no deben obstruirse cuando se filtra en dicha columna de cromatografía una solución de proteínas que además contiene fibrina polimerizada con calcio (presente en el HAP).

Además de estas limitaciones mecánicas, las propiedades superficiales específicas deben permitir la fijación de proteínas, en particular las proteínas de choque térmico y aún más en particular gp96 y Hsp70. Finalmente, los
35 polvos que han fijado las proteínas específicas de un tumor dado, en particular las de choque térmico, no deben provocar, tras la inyección, reacciones tisulares molestas, ni efectos secundarios sistémicos.

Objeto de la invención

40 La invención está definida por las reivindicaciones.

Para lograr estos objetivos de mejora, los inventores tuvieron el mérito de desarrollar un proceso para la producción de un polvo mejorado de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico.

45 Por tanto, la presente invención se refiere a un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico, caracterizado por que ha sufrido al menos una etapa de sinterización a una temperatura entre 400 °C y 600 °C. La invención se refiere a un polvo de HAP y/o fosfato tricálcico que tenga las siguientes características:

- 50 - un tamaño de partícula G tal que $G \leq 200 \mu\text{m}$, preferiblemente $0 < G \leq 25 \mu\text{m}$ o comprendido entre 25 μm y 45 μm , y
- una superficie específica SS tal que $SS \geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$.

En una realización particular, el polvo también puede tener una relación entre la anchura a media altura y la altura total de la línea en un espectro de difracción de rayos X, que se encuentra a un valor de ángulo de 2θ igual a
55 aproximadamente 31,773 grados $\pm 1 \%$, expresado como porcentaje, entre el 0,2 % y el 0,35 %, preferiblemente igual al 0,3 % $\pm 10 \%$.

También en el presente documento se describe un proceso para producir un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico, caracterizado por que comprende al menos una etapa de sinterización de un polvo de hidroxiapatita y/o de
60 fosfato tricálcico a una temperatura entre 400 °C y 600 °C.

La divulgación también se refiere a un proceso para la preparación de una composición, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 65 a) la preparación de una muestra de tumor,
- b) la extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor,

c) el paso de las proteínas extraídas en la etapa b) a través de una columna de cromatografía que contiene un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico como se ha definido anteriormente,
d) opcionalmente al menos un lavado del polvo al final de la etapa c).

5 La etapa de extracción de proteínas citoplasmáticas tiene como objetivo extraer todas las proteínas citoplasmáticas presentes en las células tumorales de la muestra, por ejemplo extraídas previamente del sujeto a tratar. En la etapa c) del proceso de preparación de la composición descrita anteriormente, la columna de cromatografía se puede presurizar manualmente.

10 El proceso para preparar la composición como se describe anteriormente puede comprender además una etapa e) de suspender el polvo resultante de la etapa c) o d) en un líquido de inyección, sin abrir la columna que contiene el polvo.

La presente invención se refiere a la composición obtenida según el método de preparación descrito anteriormente para su uso terapéutico en el tratamiento de tumores. Se utiliza como autovacuna terapéutica antitumoral.

15 La presente invención se refiere a la composición definida anteriormente para su uso en el tratamiento de linfomas B o T en un sujeto.

20 La presente invención también se refiere a composiciones como se ha descrito anteriormente para su uso terapéutico en combinación con un segundo agente terapéutico, preferiblemente un agente antitumoral y/o un agente radioterapéutico, por ejemplo uno o más de los siguientes compuestos y/o al menos uno de sus/sus sales farmacéuticamente aceptables:

- 25 • fármacos citotóxicos como
 - agentes alquilantes que incluyen mostazas con nitrógeno (mecloretoxina, ciclofosfamida, ifosfamida, mostaza de fenilalanina, clorambucilo), y
 - derivados de etilenimina (trietilentiofosforamida), alquilsulfonatos (busulfán), nitrosoureas (ciclohexil cloroetil nitrosourea, 1,3 bis-(2-cloroetil nitrosourea)), estreptoizotocina, triazenos (dimetil triazenoimidazol)
- 30 • antimetabolitos que incluyen
 - análogos del ácido fólico que comprenden el metotrexato,
 - análogos de pirimidina que comprenden 5-fluorouracilo o el arabinósido de citosina,
 - análogos de purina que comprenden 6-mercaptopurina, 6-tioguanina o desoxicoformicina;
- 35 - productos naturales o semisintéticos, incluidos los alcaloides de la vincapervina (vinblastina, vincristina)
- antibióticos que incluyen doxorubicina, mitoxantrona, daunorubicina, bleomicina, dactinomomicina, mitomicina C
- enzimas como L-asparaginasa
- epipodofilotoxinas como etopósido, tenipósido
- varios compuestos tales como Cis diamina dicloroplatino, Carboplatino, Hidroxiurea y Procarbazina.
- 40 - anticuerpos dirigidos a CD20, CD33, CD52, VEGF, HER-2neu, EGFR-1
- radioelementos tales como Yodo 131 y Calcio 45. También en el presente documento se describe un kit para implementar el proceso de preparación de la composición tal como se define anteriormente, el kit que comprende polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico según la invención, destinado a interactuar con el extracto de proteínas citoplasmáticas de una muestra de tumor y, opcionalmente, un dispositivo destinado a recibir el polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico y/o un dispositivo destinado a inyectar *in vivo* el polvo que ha interactuado con una muestra de tumor.
- 45

Descripción detallada de la invención

50 Definiciones

- Por "hidroxiapatita" se entiende la especie mineral de la familia de los fosfatos, de fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, normalmente escrita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para subrayar el hecho de que la red de la estructura cristalina incluye dos moléculas. La hidroxiapatita es el miembro hidroxilado del grupo de las apatitas. Opcionalmente, el ion OH^- puede sustituirse por flúor, cloro o carbonato.
- 55 - Por "sinterización" se entiende un proceso que consiste en calentar un polvo sin llevarlo a la fusión. Este proceso permite controlar la densidad del polvo sin tener ningún problema con la variación de volumen y dimensiones del polvo. También permite obtener materiales duros. La sinterización se puede realizar con o sin ligante. En la presente invención, los términos "sinterización" y "calcinación" significan lo mismo.
- 60 - Por "tamaño de partícula" se entiende el tamaño medio de las partículas y, más precisamente, el promedio de la dimensión más grande de las partículas no esféricas o el diámetro de las partículas esféricas. Los métodos de medición del tamaño de partículas son convencionales, por ejemplo mediante difracción láser.
- Por "superficie específica" se entiende el área superficial real de un objeto (en este caso, un grano de polvo de hidroxiapatita o fosfato tricálcico) en oposición a su superficie aparente. La superficie específica es de gran importancia para fenómenos que involucran superficies, como adsorción, absorción o intercambio de calor.
- 65 - Por "muestra" se entiende células enteras extraídas de un tumor, materiales triturados, liofilizados o también

dializados de estas células o un residuo de centrifugación obtenido de estas células.

- Por "tratamiento" se entiende una reducción de una patología y/o sus síntomas, un estancamiento en la evolución de la patología y/o sus síntomas o una recesión completa de la patología y sus síntomas y/o una mejora de las condiciones de vida. Generalmente, el término "tratamiento" implica el aspecto curativo y preventivo.
- Por "paciente" o "sujeto" se entiende un ser humano o un animal.
- Por "autovacuna" se entiende una vacuna en la que los antígenos tumorales se originan a partir de un tumor del paciente que se pretende vacunar.
- Por "agente antitumoral" se entiende un agente capaz de provocar la regresión de un tumor, tal como un agente hormonal y/o un agente quimioterapéutico.
- Por "agente radioterapéutico" se entiende la radiación ionizante utilizada localmente para destruir células cancerosas tumorales. Las radiaciones ionizantes utilizadas son principalmente fotones (o rayos) X y gamma, electrones, más raramente protones o neutrones. La "dosis de radiación" corresponde a la cantidad de energía que los rayos/radiación depositará en los tejidos. Se expresa en "grays" (Gy): un gray es igual a una energía de un julio depositada en un kilogramo de materia.

Proceso para producir un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico

El proceso para producir un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico descrito en el presente documento comprende al menos una etapa de sinterización de un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico a una temperatura entre 400 °C y 600 °C.

Existe un gran número de procesos para la producción de hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Preferiblemente, el proceso utilizado en el presente documento consiste en una precipitación lenta a alta temperatura, obtenida por doble descomposición de una sal de calcio y de una sal de fósforo en medio básico. La reacción es larga, tiene lugar a temperatura constante en un gran volumen de reacción y va seguida de una fase de maduración y una fase de lavado con agua.

El precipitado así obtenido sufre una nueva etapa de transformación: la separación sólido/solución. Esta última etapa se realiza bien por filtración, secado por vaporización y trituración, o por atomización en lecho fluidizado. La atomización permite tener partículas esféricas que cuando se utilizan en una columna de cromatografía no se compactan y permiten el paso del fluido a menor presión. Además, estas partículas son más fáciles de inyectar con agujas de pequeño diámetro.

Cualquiera que sea la técnica de separación sólido/solución seleccionada, el polvo se someterá a dos etapas de transformación específicas para la aplicación de la invención: la etapa de selección del tamaño de partícula mediante tamizado en seco para retener solo la sección de tamaño de partícula de interés, inferior a 25 μm o de entre 25 y 45 μm , y posteriormente una última etapa durante la cual el polvo se sinterizará a una temperatura óptima para asegurar una fusión de los granos que dan lugar a condiciones de superficie de polvos muy particulares, en particular caracterizadas por mediciones de superficie específicas como se define en la presente invención, a saber $\geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$. Estas dos últimas etapas se pueden invertir: selección y posteriormente sinterización, o sinterización y posteriormente selección.

En una realización preferida, la sinterización se obtiene mediante un aumento de temperatura realizado con una desviación de la temperatura ambiente para alcanzar un valor de aproximadamente 600 °C, por ejemplo entre 500 °C y 800 °C. El retorno a temperatura ambiente se realiza en horno cerrado en modo de descenso libre.

Durante el proceso, las etapas para controlar la pureza del polvo de HAP se pueden llevar a cabo mediante difracción de rayos X. Se desea la presencia de fases extrañas (principalmente CaO y fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Se definen los umbrales de aceptación para la presencia de estas impurezas. Se mide una característica particular del polvo, la anchura a media altura de ciertas líneas de difracción del espectro de difracción de rayos X del polvo producido, con el fin de validar la trayectoria térmica de la muestra analizada.

Parámetros de la síntesis (como ejemplo):

- Sales presentes: La reacción química se lleva a cabo preferiblemente poniendo una solución de nitrato de calcio tetrahidratado junto con una solución de fosfato de amonio (formado espontáneamente durante la mezcla de amoníaco con ácido ortofosfórico) en una cantidad adecuada para satisfacer la estequiometría de la siguiente reacción química. $10 \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ H}_3\text{PO}_4 + 20 \text{ NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20 \text{ NH}_4\text{NO}_3 + 22 \text{ H}_2\text{O}$
- La alcalinización del medio se obtiene mediante la adición progresiva de una solución de amoníaco diluido.
- La temperatura de reacción se mantiene a 70 °C $\pm$ 5 °C usando una camisa doble en la que circula un fluido portador de calor.
- El volumen de reacción puede variar de 70 a 150 litros para la mezcla final.
- El tiempo de reacción es de 3 a 5 horas dependiendo del volumen final deseado.
- La selección del tamaño de partícula se realiza mediante tamizado en seco. El polvo retenido es inferior a 25

µm o comprendido entre 25 y 45 µm.

- La sinterización se obtiene mediante un lento aumento de temperatura en un horno de mufla. La tasa de aumento de temperatura del horno, así como el valor y la duración de la meseta, se seleccionarán para obtener propiedades específicas de la superficie específica de la hidroxiapatita, a saber, $\geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$. Preferiblemente, se lleva a cabo un aumento de temperatura con una desviación de la temperatura ambiente para alcanzar un valor de aproximadamente 600 °C (500 °C; 800 °C). El retorno a temperatura ambiente se realiza en un horno cerrado en modo de descenso libre.

Parámetros de control

- La pureza de las hidroxiapatitas obtenidas se comprueba mediante difracción de rayos X, mediante comparación con los datos publicados en un patrón internacional: el archivo JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards). Se busca un porcentaje de semejanza del espectro del polvo obtenido con los valores de difracción de una apatita patrón listada en el patrón JCPDS con el número de archivo 09-0432.
- Las impurezas esperadas son el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ identificado en comparación con el archivo JCPDS 09-0169 y/o la cal CaO identificada en comparación con el archivo JCPDS 04-0777. Su respectiva presencia se tolera hasta aproximadamente un 5 % para cada una de estas fases.
- La medición de la anchura a media altura de la línea principal en la intensidad de difracción de la hidroxiapatita proporciona información sobre la historia térmica de los polvos producidos.
- En un espectro de difracción de rayos X, tomando un valor de ángulo de 2θ de aproximadamente 31,773 grados $\pm 1 \%$, que corresponde a la línea de difracción principal de hidroxiapatita, se realiza una medida de la anchura a media altura. A continuación, se informa de la anchura a media altura respecto a la altura total de la línea a aproximadamente 31,773 grados $\pm 1 \%$ para obtener un porcentaje. Cuanto más está tratada térmicamente una hidroxiapatita, más organizada está desde un punto de vista cristalográfico. Cuanto más finas sean las líneas de difracción de rayos X de su espectro, más estrecha será la anchura a media altura de la línea principal. Esta medida permite calificar el historial térmico del polvo obtenido. En el proceso de acuerdo con la invención, se desea particularmente una relación de anchura a media altura sobre la altura total de entre el 0,2 % y el 0,35 % y preferiblemente igual al 0,3 % $\pm 10 \%$.

Polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico

La presente invención se refiere a un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico obtenido según el proceso de producción definido anteriormente.

El polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención tiene propiedades superficiales que permiten, incluso sin agente de acoplamiento, la fijación específica de las sustancias activas, y más en particular de los antígenos tumorales y su transporte a las células del sistema de fagocitos mononucleares.

Elegimos polvos con las siguientes características:

- un tamaño de partícula G tal que $G \leq 200 \text{ µm}$, preferiblemente $0 < G \leq 25 \text{ µm}$ o comprendido entre 25 µm y 45 µm, y
- una superficie específica SS tal que $SS \geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$.

El polvo también puede tener una relación porcentual entre la anchura a media altura y la altura total de la línea en un espectro de difracción de rayos X, poniéndose a un valor de ángulo de 2θ de aproximadamente 31,773 $\pm 1 \%$, entre el 0,2 % y el 0,35 %, preferiblemente igual al 0,3 % $\pm 10 \%$.

En una realización aún más preferida de la invención, se seleccionan polvos que tienen, además del tamaño de partícula y la superficie específica como se ha definido anteriormente, una forma de partículas esféricas. Las partículas esféricas son particularmente adecuadas para la implementación según la invención, a diferencia de las partículas en forma de aguja.

El tamaño de partícula del polvo se selecciona de modo que el polvo pueda penetrar en las células diana. Además, la cantidad de proteínas fijadas en el polvo varía según la superficie específica del polvo. Por tanto, este parámetro tiene consecuencias directas sobre las propiedades finales del polvo para inducir una respuesta inmunitaria y generar un tratamiento de las células o de la patología diana. Por último, la forma esférica de las partículas permite una mejor fijación de las proteínas específicas, pero sobre todo una mejor resistencia física de las partículas de polvo en la columna, en particular cuando esta última se presuriza manualmente. Por tanto, es importante encontrar el equilibrio adecuado entre estos parámetros para tener el polvo y una composición terapéutica óptima.

El tamaño de partícula y la superficie específica están influenciados por la temperatura de sinterización utilizada en el proceso para producir polvo de HAP y/o fosfato tricálcico. De hecho, cuando la temperatura de sinterización es demasiado alta en el proceso de producción del polvo de HAP y/o fosfato tricálcico mencionado anteriormente, el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico obtenido no tiene una superficie específica satisfactoria porque no permite fijar proteínas suficientemente y, cuando se introduce *in vivo* en el paciente, no inducirá por tanto una reacción inmune

suficiente a través de las células presentadoras de antígeno. Por otro lado, si la temperatura de sinterización es demasiado baja o nula en el proceso de producción de polvo de HAP y/o fosfato tricálcico, el polvo obtenido no es suficientemente resistente y se vuelve soluble a los distintos pH que se encuentran en el medio celular. Además, una vez húmedos, los polvos no esféricos, no cerámicos y con un tamaño de partícula inadecuado tienden a aglomerarse. Por tanto, es necesario que no sean demasiado sensibles a la humidificación. Así, con una temperatura de sinterización demasiado baja, las columnas de polvo de HAP y/o fosfato tricálcico, sobre las que se filtrará una muestra de tumor para retener las proteínas específicas del tumor del paciente (y en particular las proteínas del choque térmico), se obstruirán y ya no dejarán pasar ningún líquido. Además, los polvos muy solubles liberan mucho calcio y, además del inconveniente de la obstrucción, pueden polimerizar la fibrina contenida generalmente en las muestras a filtrar y así obstruir la columna.

Es mérito de los inventores haber demostrado que la temperatura de sinterización óptima para la preparación de polvo de HAP y/o fosfato tricálcico se encuentra entre 400 °C y 600 °C.

El polvo de HAP y/o fosfato tricálcico obtenido mediante el proceso de producción anterior se puede utilizar directamente, una vez cargado con proteínas específicas del tumor de un paciente, como fármaco inyectable directamente en el cuerpo a fin de tratar dicho tumor.

Este nuevo proceso para la producción de polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico permite disponer de un nuevo polvo de HAP y/o fosfato tricálcico que es un nuevo material vector más eficiente que lleva a cabo tanto la purificación, la vectorización en el cuerpo como el transporte de sustancias activas en las células diana: células presentadoras de antígeno (APC).

Proceso para la preparación de una composición farmacéutica

La presente invención se refiere a una composición a base de dicho polvo de HAP y/o fosfato tricálcico.

El proceso de preparación de la composición farmacéutica se caracteriza por que comprende las siguientes etapas:

- a) la preparación de una muestra de tumor,
- b) la extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor,
- c) el paso de las proteínas extraídas en la etapa b) a través de una columna de cromatografía que contiene un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico como se ha definido anteriormente,
- d) opcionalmente al menos un lavado del polvo al final de la etapa c).

La preparación de la muestra de tumor (etapa a) consiste en tomar una muestra celular *in vivo*, directamente del tumor del paciente. Preferiblemente, la muestra se toma por punción en el tumor, por ejemplo de una biopsia de un paciente que padece cáncer. También pueden ser muestras tumorales que comprendan células tumorales del paciente a tratar, ya tomadas previamente, siendo estas últimas materiales triturados, liofilizados, dializados o un sedimento de centrifugación.

La extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor (etapa b) se puede realizar según métodos convencionales conocidos. En una realización, el método de extracción tiene como objetivo extraer todas las proteínas citoplasmáticas de las células tumorales en la muestra, en particular no incluye una etapa de selección o purificación de proteínas específicas, y en particular de antígenos tumorales opcionalmente contenidos en proteínas citoplasmáticas.

Preferiblemente, la etapa de extraer proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor se lleva a cabo de manera ventajosa como sigue:

- 1) opcionalmente congelación del tejido tumoral,
- 2) trituración del tejido tumoral,
- 3) solubilización o suspensión de los antígenos tumorales citoplasmáticos en una solución de NaHCO₃,
- 4) centrifugación,
- 5) separación del sedimento y el sobrenadante.

El extracto de proteína citoplasmática se pasa o se filtra a través de una columna de cromatografía que contiene polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención y como se ha definido anteriormente (etapa c del proceso de preparación de la composición). Esta etapa consiste en poner en contacto el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención con el extracto proteico de la etapa b del proceso. El polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención tiene la ventaja de ser suficientemente resistente para no obstruirse en la columna y así poder dejar "pasar" el extracto de proteína de la muestra de tumor que se filtrará en la columna.

De manera ventajosa, la columna de cromatografía que contiene el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención está presurizada. La solución de proteína que se filtrará en la columna que contiene el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico teóricamente no puede atravesar el polvo a presión atmosférica, por eso en este caso es necesario

utilizar una columna que se pueda presurizar manualmente mediante un pistón, por ejemplo. En la práctica, la puesta en contacto puede ser, por ejemplo, una purificación realizada mediante una o más columnas separadas o no por un sistema de depósito en el que se pueden introducir o sustraer determinadas soluciones y por el que o las que podemos filtrar un tumor triturado. En una realización particular, si es necesario, la proteína o proteínas adsorbidas en la columna de cromatografía se pueden recuperar, por ejemplo, por elución de la columna o columnas usando una solución tampón –preferiblemente tampón fosfato– de molaridad y pH apropiados, con el eluido así obtenido que comprende antígenos tumorales y/o los factores adyuvantes inmovilizados y buscados. Esta es una técnica de cromatografía.

- 10 En otra realización preferida, se recupera una composición que comprende la proteína o proteínas del tumor de un paciente adsorbido en el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico.

La etapa de lavado de la columna (etapa d) permite separar el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico (soporte mineral) de las proteínas de la muestra de tumor que no se adsorben específicamente. Esta etapa se lleva a cabo ventajosamente varias veces con tampones de fosfato o solución salina de concentración creciente. Así, el primer lavado se realiza con un tampón fosfato o una solución de NaCl de concentración menor o igual a 200 mM mientras que se puede realizar un segundo lavado con un tampón fosfato o una solución de NaCl de concentración comprendida entre 300 a 500 mM.

- 20 Así, los inventores han observado que el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención, después de haberse puesto en contacto con las proteínas extraídas de la muestra de tumor, fija ventajosamente las proteínas específicas de un tumor de un paciente determinado o las proteínas que estimulan el sistema inmunológico, que representan las proteínas inmunogénicas.

- 25 En una realización particular de la invención, una vez adsorbido, el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico de la etapa c) o d) del proceso de preparación de la composición farmacéutica se resuspende ventajosamente con una solución adecuada, preferiblemente un líquido de inyección (etapa e) para que posteriormente se pueda administrar al paciente. Ventajosamente podemos añadirle Carboximetilcelulosa (CMC), un excipiente que permite facilitar la inyección. Por tanto, el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico que lleva las proteínas específicas del tumor de un paciente se usa directamente como composición farmacéutica o medicamento.

En una forma preferida de la invención, la columna de cromatografía que contiene el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención tiene la capacidad de cerrarse por sus dos extremos. Esto hace posible inyectar un líquido de suspensión o una solución o líquido inyectable en la columna y posteriormente poder administrarlo directamente al sujeto o paciente. El cierre de la columna por ambos extremos es ventajoso porque, una vez introducido el líquido de inyección en la columna, esta se agita para suspender correctamente el polvo según la invención cargado con proteínas, preferiblemente proteínas específicas del tumor del paciente. La no apertura de la columna es una ventaja considerable porque permite limitar los riesgos de contaminación.

- 40 En esta realización particular, el proceso de preparación del medicamento comprende la sucesión de las siguientes etapas:

- a) la preparación de la muestra de tumor que comprende células tumorales, por ejemplo del sujeto a tratar,
 b) la extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor que permite la suspensión o solubilización de los antígenos tumorales de interés,
 c) la filtración de dichas proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor a través de al menos una columna de cromatografía que contiene polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención,
 d) opcionalmente el lavado o lavados de la columna de cromatografía con soluciones tampón de determinada concentración iónica y pH,
 d-bis) cerrar la columna de cromatografía que contiene el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención,
 e) suspender el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico en una solución inyectable.

La etapa d-bis) ocurre independientemente de que haya o no una etapa relacionada con el lavado o los lavados de la columna de cromatografía.

Composición farmacéutica

La composición según la invención se obtiene del proceso de producción definido anteriormente. Corresponde al polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención cargado con proteínas adsorbidas sobre dicho polvo de HAP y/o fosfato tricálcico, según el proceso de la invención.

Sin pretender imponer ninguna teoría, la composición según la invención así obtenida comprende antígenos tumorales asociados no covalentemente con el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico.

- 65 En particular, en una realización preferida, la composición según la invención comprende antígenos tumorales asociados no covalentemente al polvo de HAP y/o fosfato tricálcico, seleccionados entre:

- proteínas que se unen a CD91.
- proteínas de choque térmico; HSP70, gp96, HSP27 y sus péptidos asociados.
- β -catenina, P-cadherina, Her-2/neu.

5 Preferiblemente, al menos el 90 %, por ejemplo al menos el 95 %, o incluso al menos el 99 % de las proteínas (% en moles) que se unen a la membrana celular de las APC se unen a los receptores CD91. Las proteínas de la vacuna que se unen a otros receptores celulares no han sido detectadas por inmunohistoquímica.

10 Para caracterizar la composición obtenida tras la adsorción de proteínas tumorales, los inventores han descubierto que tras la migración en gel de electroforesis, las composiciones según la invención comprenden todas al menos cuatro bandas de migración de pesos moleculares comprendidos entre 110 y 40 kDa (véase **Figura 8**).

15 En una realización alternativa, la composición según la invención se obtiene del proceso de preparación que comprende las siguientes etapas:

- a. la preparación de una muestra de tumor que comprende células tumorales, por ejemplo, del sujeto a tratar,
- b. la extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor,
- c. el paso de las proteínas extraídas en la etapa b) a través de una columna cromatográfica que contiene un
- 20 polvo de hidroxapatita y/o de fosfato tricálcico que tiene una superficie específica SS tal que $SS \geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$,
- d. opcionalmente, al menos un lavado del polvo al final de la etapa c.

La composición según la invención también puede comprender excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados. En una realización particular, la composición según la invención comprende carboximetilcelulosa, utilizada como

25 aditivo para mantener los polvos en suspensión en la solución. Por ejemplo, es una solución inyectable que consta del 2 % de carboximetilcelulosa en una solución de NaCl 0,02 M.

Uso de composición

30 La composición según la invención descrita anteriormente se puede utilizar ventajosamente como medicamento.

Se utiliza, por ejemplo, en el tratamiento de tumores.

35 La composición según la invención se usa en el tratamiento del linfoma B o T.

Esta composición es útil en particular en el tratamiento de patologías en seres humanos, o en animales, por ejemplo mamíferos, y en particular perros, caballos o gatos. Se ha demostrado en particular que el uso de la composición da resultados particularmente convincentes e interesantes en el tratamiento de patologías caninas, y por ejemplo en el

40 tratamiento del osteosarcoma canino y linfomas B o T caninos o en el tratamiento de patologías equinas como melanoma equino o en el tratamiento de patologías felinas como fibrosarcoma felino (véase ejemplos a continuación). Sin embargo, estos tratamientos se pueden aplicar a cualquier ser vivo, ser humano, mamífero u otro animal que pueda desarrollar tumores cancerosos.

La composición según la invención comprende por tanto el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico que ha adsorbido los

45 antígenos tumorales específicos del paciente y que ha sido resuspendido. La composición puede incluir preferiblemente los siguientes antígenos: proteínas de choque térmico, HSP70, gp96, HSP27 y sus péptidos asociados, β -catenina, P-cadherina, Her-2/neu. Preferiblemente, al menos el 90 %, por ejemplo al menos el 95 %, o incluso al menos el 99 % de las proteínas (% en moles) que se unen a la membrana celular de las APC se unen a los receptores CD91. Se utiliza, por ejemplo, para tratamientos autólogos mediante inmunoterapia, en particular

50 como vacuna antitumoral. Es una composición utilizada como autovacuna, preferiblemente como autovacuna antitumoral.

La composición se puede obtener mediante el proceso que comprende las siguientes etapas:

- a. la preparación de una muestra de tumor que comprende células tumorales, por ejemplo, del sujeto a tratar,
- b. la extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor,
- c. el paso de las proteínas extraídas en la etapa b) a través de una columna de cromatografía que contiene un
- 60 polvo de hidroxapatita y/o de fosfato tricálcico,
- d. opcionalmente al menos un lavado del polvo al final de la etapa c).

Según la presente divulgación, esta composición se puede utilizar en el tratamiento de las siguientes patologías o de al menos una de las siguientes patologías:

osteosarcomas, linfomas B o T, tumores de mama, melanomas, hemangiosarcomas, mastocitomas, fibrosarcomas, tumores del cerebro o de sistema nervioso central, schwannomas, mesoteliomas, seminomas, teratomas o blastomas

65 en un sujeto, hombre o animal.

Por tanto, la composición en cuestión comprende un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico que se ha sometido a una etapa de sinterización limitada a una temperatura determinada, por ejemplo entre 400 °C y 600 °C.

En otra realización particular, la composición según la invención puede usarse para su uso terapéutico en combinación con un agente terapéutico, preferiblemente un agente antitumoral y/o un agente radioterapéutico.

Mientras no se alcance un estado de aplasia o cuasiaplasia en el sujeto a tratar, es posible combinar ventajosamente la inmunoterapia (asociada al polvo según la invención) y la quimioterapia. El efecto de las moléculas de quimioterapia sobre las células T reguladoras sin duda ayuda a reequilibrar el balance de las células inmunitarias y las posibilidades de inmunización. Por tanto, la inmunoterapia puede asociarse a cualquier tipo de medicamento contra el cáncer siempre que la linfopenia no sea demasiado importante. Puede asociarse a fármacos anticancerosos con una dosis citotóxica o con una dosis menor conocida como metronómica, por ejemplo con dosis de ciclofosfamida de 50 mg/día asociada a 2,5 mg de metotrexato en el primer y segundo día de tratamiento, en el caso del cáncer de mama recurrente en seres humanos.

Como agente antitumoral, pueden ser moléculas quimioterapéuticas. Estas últimas se clasifican en agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, inhibidores de la topoisomerasa y antibióticos antitumorales. Todos estos medicamentos afectan hasta cierto punto la mitosis y/o la síntesis y función del ADN.

También pueden ser agentes que no actúan directamente sobre el ADN tales como inhibidores de tirosina quinasa y en particular el inhibidor de tirosina quinasa mesilato de imatinib que se dirige directamente a una anomalía molecular en ciertos tipos de cánceres tales como leucemia y cáncer de colon.

Otros fármacos de combinación en polvo según la invención modifican el comportamiento de las células tumorales sin atacar directamente a las células. Las hormonas se utilizan en particular para este tipo de terapia adyuvante.

Los agentes alquilantes tienen la capacidad de añadir un grupo alquilo a un gran número de grupos electronegativos en la célula. Limitan el crecimiento celular al unirse a los nucleótidos de guanina de la doble hélice del ADN. De este modo, las dos hebras de ADN ya no pueden desenrollarse ni separarse. La célula ya no puede dividirse. Estos agentes generalmente no actúan específicamente sobre la célula cancerosa y algunos requieren conversión *in vivo* en sustancias activas (por ejemplo, ciclofosfamida). Como ejemplo de agente alquilante utilizable en quimioterapia, se pueden citar: cisplatino, carboplatino (o paraplatino), ifosfamida, clorambucilo, busulfán, tiotepa. Entre los agentes alquilantes, se ha demostrado que la ciclofosfamida es particularmente beneficiosa para la inmunoterapia. Esta molécula potencia las reacciones de hipersensibilidad retardada. El mecanismo de potenciación de la hipersensibilidad retardada se produce al reducir las funciones de los linfocitos T reguladores.

Los antimetabolitos actúan sustituyendo a las purinas o pirimidinas que son nucleótidos, componentes elementales del ADN. Por tanto, se producen errores en la disposición de las bases durante la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular, deteniendo así el desarrollo y la división celular y provocando la apoptosis.

Los antimetabolitos se dividen en varios grupos según el tipo de diana que alcanzan:

- antipirimidinas. Entre estas, cabe mencionar el 5-fluorouracilo (5-FU) que inhibe la timidilato sintasa.
- antipurinas. Entre estas, cabe mencionar la fludarabina que inhibe la ADN polimerasa, la ADN primasa y la ADN ligasa I y es exclusivamente activa durante la fase S ya que estas enzimas son muy activas durante la replicación celular.
- antifolatos. El metotrexato (antagonista del folato) inhibe la dihidrofolato reductasa, una enzima esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas.
- hidroxiurea.

Los alcaloides son derivados de las plantas y bloquean la división celular al evitar la síntesis de microtúbulos y la formación del huso mitótico, vital para la división celular.

Entre los alcaloides que se pueden usar en la presente composición, se pueden mencionar:

- alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina o vinorelbina que se unen a sitios específicos de tubulina e inhiben el ensamblaje de tubulinas en microtúbulos, esenciales para la división celular,
- taxanos como el paclitaxel (de *Taxus brevifolia*) con su derivado sintético docetaxel que inhibe la división celular estimulando la polimerización de las tubulinas, mejorando la formación y estabilidad de los microtúbulos que posteriormente no pueden degradarse, evitando así que los cromosomas migren hacia los polos del núcleo,
- epítomas, productos de una mixobacteria que tienen el mismo mecanismo que los taxanos y parecen tener una actividad anticancerígena similar.

Los inhibidores de la topoisomerasa actúan por definición sobre las topoisomerasas, que son enzimas esenciales que mantienen la topología del ADN. La inhibición de la topoisomerasa de tipo I o de tipo II interfiere con la

transcripción y replicación del ADN al alterar el superenrollamiento del ADN.

Como inhibidores de la topoisomerasa tipo I, se pueden mencionar derivados de camptotecina.

- 5 Como inhibidores de la topoisomerasa tipo II, se pueden mencionar amsacrina, antraciclinas, derivados de la epipodofilotoxina.

Hay muchos tipos diferentes de antibióticos antitumorales. Generalmente, previenen la división celular por varios medios:

- 10
- la unión de ADN, al interponerse entre dos bases de nucleótidos adyacentes y evitar que se separen,
 - la inhibición del ARN, evitando la síntesis de enzimas,
 - el impedimento de la replicación celular.

- 15 Son producidos por varias cepas de la bacteria *Streptomyces*.

Entre estos, se pueden mencionar las antraciclinas: doxorubicinas y daunorrubicina que también inhiben la topoisomerasa tipo II, actinomicina D, mitomicina C, plicamicina, bleomicina que actúa de manera única oxidando el complejo ADN-bleomicina-Fe (II) formando así radicales libres que inducen daño y aberraciones cromosómicas.

- 20 Entre estos podemos clasificar los antiasparaginas (L-asparaginasa). La asparagina es un aminoácido esencial para ciertas células cancerosas que no pueden sintetizarla, a diferencia de las células normales. Por tanto, dependen de la asparagina circulante.

- 25 También existe una nueva clase de fármacos anticancerosos cuya asociación tiene interés con las vacunas antitumorales: anticuerpos monoclonales como anti VEGF, anti CD20, CD19, CD30 y otros.

Las consecuencias biológicas de la radiación ionizante en los tejidos vivos se descubrieron poco después del descubrimiento de los rayos X. La mayoría de los datos radiobiológicos muestran que el ADN es la diana más importante para los efectos biológicos en forma de unión de bases, rotura de la cadena en el enlace azúcar-fosfato.

- 30 En la célula, la lesión inducida radiológicamente da lugar a mutaciones y/o imposibilidad de división celular. Estas consecuencias son más importantes para las células en proliferación, ya que las células tumorales también pueden ser células sanas y provocar efectos secundarios igualmente importantes.

- 35 Podemos distinguir cuatro técnicas principales de radioterapia: radioterapia externa, radiocirugía, braquiterapia y radioterapia metabólica. Cada una de ellas tiene sus indicaciones según el tipo de tumor y su localización.

- 40
- En la radioterapia externa, la más utilizada, la fuente de radiación está fuera del sujeto a tratar. Las bombas de cobalto, que utilizan una fuente radiactiva y de cobalto 60, prácticamente han desaparecido en favor de los aceleradores de electrones lineales que producen haces de rayos X de alta energía y haces de electrones. Hay tres técnicas principales: radioterapia convencional, radioterapia conformacional 3D (en 3 dimensiones) y tomoterapia o radioterapia helicoidal.
 - En braquiterapia, la fuente radiactiva se pone durante un tiempo limitado (normalmente unas horas) o de forma permanente, dentro del sujeto a tratar, en el tumor o en una cavidad en contacto con ella. Tres técnicas principales, a su vez, se subdividen en sub-técnicas según su tasa de dosis (tasa baja y tasa alta) y su tipo de carga (manual o diferida). Estas son la braquiterapia intersticial, la braquiterapia endocavitaria y la braquiterapia endoluminal.
 - En la radioterapia metabólica, la fuente radiactiva no sellada, en forma líquida o en cápsula, es inyectable y se adhiere a las células diana.

- 50 Según el tipo de tumor, su localización, su tamaño, su extensión y su etapa, el estado general del sujeto a tratar y los síntomas asociados, existen tres situaciones muy diferentes en las que utilizaremos la radioterapia para fines muy concretos:

- 55
- Radioterapia curativa, cuyo objetivo es irradiar la mayoría de las células cancerosas para lograr el control o incluso la curación del cáncer. Esto implica la ausencia de lesiones a distancia. Está indicado en aproximadamente la mitad de las irradiaciones. Se utiliza ventajosamente sola o en combinación con cirugía y/o quimioterapia. La dosis requerida depende del tipo y tamaño del tumor, algunos son muy radiosensibles mientras que otros son radio-resistentes. El protocolo habitual administra una dosis de 10 Gy por semana a razón de 5 sesiones de 2 Gy por día. La dosis total varía de 30 a 70 Gy según el caso.
 - 60 - Radioterapia paliativa, cuyo objetivo no es curar el cáncer sino aliviar al sujeto a tratar con dosis ligeras, permitiendo reducir el dolor derivado de un cáncer demasiado avanzado para ser tratado. Está dirigido a cánceres que evolucionan demasiado localmente o son metastásicos. Dado que el tratamiento es paliativo, debe ser de corta duración y poco agresivo, con el fin de causar las menores molestias posibles al paciente.
 - 65 - Radioterapia sintomática, cuyo objetivo es aliviar un síntoma importante y especialmente molesto para el paciente. Su eficacia es: analgésica, hemostática o descompresiva.

En todas estas técnicas, las radiaciones utilizadas son fotones (o rayos) X y gamma, electrones, y más raramente protones o neutrones.

Por tanto, la invención también se refiere a una combinación de tratamiento terapéutico que comprende la administración de una dosis eficaz del polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico como se ha definido anteriormente y/o de la composición de la invención como se ha definido anteriormente con al menos una dosis eficaz de un agente terapéutico, preferiblemente un agente antitumoral y/o un agente radioterapéutico como se ha definido anteriormente.

La administración de la composición según la invención (autovacuna antitumoral) y del agente antitumoral puede realizarse de forma concomitante, en forma de una composición única o de dos composiciones separadas, o en momentos diferentes, según el protocolo óptimo según el paciente y la patología a tratar.

Los inventores han demostrado, notablemente, la remisión completa de ciertos tumores, en particular en perros, cuando la composición de acuerdo con la invención se usa en combinación con otro agente antitumoral (véanse los ejemplos a continuación).

La composición tal como se define anteriormente combinada con al menos un agente terapéutico tal como un agente antitumoral definido anteriormente y/o al menos un agente radioterapéutico, por tanto, también representa una combinación de fármacos cubierta por la presente invención.

La composición según la invención se administra preferiblemente mediante inyección.

Cuando se trata de la combinación de fármacos, la inyección de la composición y el agente terapéutico puede ser simultánea o independiente en el tiempo.

Una de las ventajas de la composición según la invención es que es particularmente fiable en términos de contaminación. De hecho, su proceso de producción se puede realizar casi en un ambiente completamente cerrado y con el mismo polvo de HAP y/o fosfato tricálcico, lo que limita los riesgos de contaminación. Preferiblemente, no hay transferencia de un soporte de HAP y/o fosfato tricálcico a otro y es el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico usado para purificar y fijar materiales biológicos (preferiblemente proteínas específicas del tumor dado del paciente y más en particular proteínas de choque térmico) que se inyectará directamente sin retirarse previamente. Por tanto, la composición farmacéutica está constituida tanto por polvo de HAP y/o fosfato tricálcico como también por los materiales biológicos que se adsorben sobre este último.

Otra característica ventajosa de la composición es que está destinada a ser fagocitada por macrófagos y/u otras células APC y/o células dendríticas. También permite el transporte *in vivo* de una o más sustancias activas. En otras palabras, el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención permite vectorizar cualquier sustancia/molécula adsorbible sobre esta última, utilizando las células presentadoras de antígeno APC u otras células similares.

La composición puede estar destinada a activar macrófagos y/u otras células APC, es decir provocar la síntesis de sustancias seleccionadas del grupo que comprende citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento y/o hacer madurar las células dendríticas.

Una vez inyectada en un tejido conjuntivo, la composición según la invención puede provocar un influjo local de macrófagos, células dendríticas y/u otras células APC que presenten el antígeno o antígenos adsorbidos sobre el polvo de HAP y/o fosfato tricálcico.

Según un método ventajoso, la composición según la invención, una vez administrada *in vivo* o *in vitro*, permite la liberación prolongada (por ejemplo, de unas horas a varios días) de la sustancia o sustancias activas adsorbidas sobre polvo de HAP y/o fosfato tricálcico.

Cuando se utiliza en forma de unidad galénica, la composición farmacéutica o medicamento según la invención se utiliza ventajosamente en una cantidad entre 15 y 100 µg dosis/unidad galénica.

En una realización particular, una dosis administrada por inyección al paciente, comprende entre 30 y 50 mg de hidroxiapatita y entre 1000 y 2000 µg de proteínas, preferiblemente con el 100 % o, al menos el 90 %, por ejemplo al menos el 95 %, o incluso al menos el 99 % de las proteínas (% en moles) que se unen a la membrana celular de las APC se unen a los receptores CD91. En el sentido de la invención, el término CD91 se refiere al receptor transmembrana expresado en seres humanos, en particular de secuencia proteica (UNIPROT) Q07954, también denominada LRP1, y que interactúa con proteínas HSP, en particular gp96.

En una forma particular de uso de la composición, es ventajoso realizar una revacunación de los sujetos afectados. Por tanto, en una realización específica, es preferible realizar dos etapas sucesivas de administración de la autovacuna antitumoral. En particular, la segunda vacuna se obtiene preferiblemente de una nueva muestra de tumores en el sujeto afectado.

De hecho, se supone que los tratamientos antitumorales eliminan los diferentes clones que constituyen un tumor de forma diferente debido a su sensibilidad variable a los tratamientos. Los clones más sensibles se eliminarían y los más resistentes se desarrollarían para ocupar el nicho dejado por los anteriores. Es por esto que, cuando el tumor escapa a la primera respuesta a la vacuna, está justificado realizar una segunda vacuna a partir de una nueva muestra para estimular el sistema inmunológico frente a todas las proteínas anormales que caracterizan a los nuevos clones dominantes.

Kit para implementar el proceso de preparación de la composición

La divulgación se refiere además a un kit para implementar el proceso para preparar la composición como se define anteriormente (con o sin la etapa de sinterización del polvo), caracterizado por que comprende el polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico como se ha definido anteriormente, destinado a interactuar con el proteínas citoplasmáticas extraídas de una muestra de tumor.

Este kit opcionalmente incluye un dispositivo destinado a recibir el polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico y/o un dispositivo destinado a administrar, preferiblemente a inyectar, *in vivo* dicho polvo que ha interactuado con las proteínas citoplasmáticas de una muestra de tumor. El dispositivo destinado a administrar el polvo *in vivo* puede ser, por ejemplo, una jeringa.

Este kit permite ventajosamente a un profesional de la medicina animal o humana purificar los péptidos específicos del tumor usando polvos de HAP y/o fosfato tricálcico, para fijarlos en estos mismos polvos que posteriormente se inyectarán en un paciente. Preferiblemente, los péptidos específicos del tumor unidos a las proteínas de choque térmico unidas al polvo de HAP y/o fosfato tricálcico proceden del paciente en el que se volverá a administrar el polvo, preferiblemente en el que se volverá a reinyectar. La inyección en el paciente se realiza preferiblemente en los tejidos subcutáneos o intradérmicos.

En una realización alternativa del kit, este último comprende opcionalmente uno o más de los siguientes medios, además del polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico:

- medios para tomar la muestra del tumor
- medios para extraer proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor, como una solución de NaHCO_3 o Na_2CO_3 .
- medios para fijar las proteínas específicas del tumor al polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico,
- medios que permiten la suspensión del polvo de HAP y/o fosfato tricálcico cargado con proteínas específicas del tumor,
- medios que permiten administrar, preferiblemente inyectar, *in vivo* dicha suspensión.

En particular, de la descripción anterior de la invención se desprende que las partículas de HAP y/o fosfato tricálcico según la invención son un buen vector para transportar las proteínas específicas del tumor de un paciente al interior de los macrófagos y células presentadoras de antígenos y que están adaptadas para tratar patologías como el cáncer. Esto se verá más claramente leyendo los siguientes ejemplos.

Descripción de las figuras

Figura 1: La **Figura 1** ilustra el espectro de difracción de rayos X de un polvo de hidroxiapatita sinterizado a 600 °C según la invención. En el eje x aparece 2 θ correspondiente al ángulo de difracción y en el eje y la intensidad (altura) de los diferentes picos.

Figura 2: La **Figura 2** ilustra la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina después de 1 $^{1/2}$ h de contacto del polvo con las células y en función de las diferentes dosis de polvo.

Figura 3: La **Figura 3** ilustra la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina después de 3 $^{1/2}$ h de contacto del polvo con las células y en función de las diferentes dosis de polvo.

Figura 4: La **Figura 4** ilustra la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina después de 7 $^{1/2}$ h de contacto del polvo con las células y en función de las diferentes dosis de polvo.

Figura 5: ▲: sin tratamiento; ■: vacuna según la invención; ◆: quimioterapia según Takuo Shida et al. Low-dose chemotherapy for canine appendicular osteosarcoma, Journal of Japan Veterinary Cancer Society, vol.2, No.1, 1-6 2011.

Figura 6: La **Figura 6** ilustra los resultados del estudio. Se trata de tres curvas que muestran la supervivencia en días y el porcentaje de supervivencia de los perros con linfoma B tratados con la autovacuna según la presente invención sola (-▲-), de los perros tratados con la autovacuna según la presente invención en combinación con quimioterapia (-◆-) y de los perros tratados con un placebo en combinación con quimioterapia (-■-).

Figura 7: protocolos de quimioterapia + vacunas:

Asp corresponde a L-asparaginasa a 400 UI/kg.

Vinc corresponde a vincristina a 0,75 mg/m².

Ciclo corresponde a ciclofosfamida a 250 mg/m².

Adri corresponde a adriblastina IntraVenosa (IV) a 30 mg/m².

Lomu corresponde a lomustina a 60-80 mg/m².

El recuadro gris corresponde a prednisona a 1 mg/kg/día.

El recuadro negro corresponde a prednisona oral a 1 mg/kg/día/2.

X corresponde a una inyección de la vacuna que comprende la composición según la invención.

Figura 8: Gel de electroforesis de las proteínas de las composiciones según la presente invención que muestra la presencia de 4 bandas de migración entre 40 y 110 kDa.

Ejemplos

Ejemplo 1: Proceso para la preparación de HAP en polvo

El proceso para la preparación de hidroxiapatita fosfocálcica estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ consiste en una precipitación lenta a alta temperatura, obtenida por doble descomposición de una sal de calcio y una sal de fósforo en medio básico. La reacción es larga, tiene lugar a temperatura constante en un gran volumen de reacción y va seguida de una fase de maduración y una fase de lavado con agua.

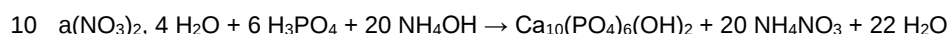
El precipitado así obtenido se somete a una nueva etapa de transformación: la separación sólido/solución. Esta última etapa se realiza bien por filtración, secado por vaporización y trituración, o bien por atomización en lecho fluidizado.

Independientemente de cuál sea la técnica de separación sólido/solución seleccionada, el polvo se someterá a dos etapas de transformación específicas para la aplicación de la invención: la etapa de selección del tamaño de partícula mediante tamizado en seco para retener solo la sección de tamaño de partícula de interés, inferior a 25 μm o está comprendido entre 25 y 45 μm , y posteriormente, una etapa durante la cual el polvo se sinterizará a una temperatura óptima para asegurar una fusión de los granos que dan lugar a condiciones superficiales de los polvos muy particulares, en particular caracterizados por mediciones de superficie específicas como se define en la presente invención, a saber $\geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$.

Durante el proceso, las etapas para verificar la pureza del polvo de HAP se llevan a cabo mediante difracción de rayos X. Se mide la anchura a media altura de determinadas líneas de difracción del espectro de difracción de rayos X del polvo producido, para validar la trayectoria térmica de la muestra analizada.

Parámetros de síntesis:

- Sales presentes: La reacción química se lleva a cabo preferiblemente poniendo una solución de nitrato de calcio tetrahidratado junto con una solución de fosfato de amonio (formado espontáneamente durante la mezcla de amoniaco con ácido ortofosfórico) en una cantidad adecuada para satisfacer la estequiometría de la siguiente reacción química.



- La alcalinización del medio se obtiene mediante la adición progresiva de una solución de amoniaco diluido.
- La temperatura de reacción se mantiene a 70 °C $\pm$ 5 °C usando una camisa doble en la que circula un fluido portador de calor.
- El volumen de reacción puede variar de 70 a 150 litros para la mezcla final.
- El tiempo de reacción es de 3 a 5 horas dependiendo del volumen final deseado.
- La selección del tamaño de partícula se realiza mediante tamizado en seco. El polvo retenido es preferiblemente inferior a 25 μm o está comprendido entre 25 y 45 μm .
- La sinterización se obtiene mediante un lento aumento de la temperatura en un horno de mufla. La tasa de aumento de temperatura del horno, así como el valor y la duración de la meseta, se seleccionarán para obtener propiedades específicas de la superficie específica de la hidroxiapatita, a saber, $\geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$. Preferiblemente, se lleva a cabo un aumento de temperatura para alcanzar un valor de 600 °C (-100 °C; +200 °C). Se detiene el calentamiento y se inicia un descenso lento y libre hasta volver a temperatura ambiente con el horno cerrado.

Parámetros de control

- La pureza del polvo de hidroxiapatita obtenido se comprueba mediante difracción de rayos X, comparándolo con los datos publicados en una norma internacional: el archivo JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards). Se busca un porcentaje de semejanza del espectro del polvo obtenido con los valores de difracción de una apatita patrón listada en el patrón JCPDS con el número de archivo 09-0432.
- Las impurezas esperadas son fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y/o cal CaO . Su presencia se tolera en aproximadamente un 5 % para cada una de estas fases.
- La medición de la anchura a media altura de la línea principal en la intensidad de difracción de la hidroxiapatita proporciona información sobre la historia térmica de los polvos producidos.

- En un espectro de difracción de rayos X, tomando un valor de ángulo de 2θ de aproximadamente $31,773$ grados ± 1 %, que corresponde a la línea de difracción principal de la hidroxiapatita, se realiza una medida de la anchura a media altura. A continuación, se informa de la anchura a media altura respecto a la altura total de la línea a aproximadamente $31,773$ grados ± 1 % para obtener un porcentaje. Cuanto más tratada térmicamente está una hidroxiapatita, más organizada está desde un punto de vista cristalográfico. Cuanto más finas sean las líneas de difracción de rayos X de su espectro, más estrecha será la anchura a media altura de la línea principal. Esta medida permite calificar el historial térmico del polvo obtenido. En el método según la invención, la relación entre la anchura a media altura y la altura total es del 0,301 %.

La **Figura 1** ilustra el espectro de difracción de rayos X de un polvo de hidroxiapatita sinterizado a 600°C según la invención. En el eje x aparece 2θ correspondiente al ángulo de difracción y en el eje y la intensidad (altura) de los diferentes picos.

	100 %		media altura	límite inferior	límite superior	anchura a media altura	anchura a media altura/altura
0	31,85	142,7	71,3	31,67	32,265	0,595	0,417 %
300	31,88	134,7	73,3	31,645	32,135	0,490	0,364 %
600	31,85	152,3	76,1	31,677	32,135	0,458	0,301 %
900	31,85	270	135	31,742	31,946	0,204	0,076 %
1000	31,81	332	166	31,731	31,903	0,172	0,052 %

Al final de este proceso, se observan las siguientes características en el polvo:

- las partículas tienen un tamaño de partícula inferior a $200\ \mu\text{m}$ y la mayoría se encuentra entre 0 y $25\ \mu\text{m}$ o entre 25 y $45\ \mu\text{m}$;
- las partículas tienen una superficie específica superior a $30\ \text{m}^2/\text{g}$;
- las partículas son de forma esférica o irregular según las opciones de fabricación seleccionadas;
- en el espectro de difracción de rayos X bajo las condiciones de control definidas anteriormente, la relación entre la anchura a media altura y la altura total es igual al 0,301 %.

Ejemplo 2: Proceso de preparación de la composición

a) Preparación de la muestra de tumor

Una fracción de aproximadamente $1\ \text{cm}^3$ de un tumor previamente extirpado con un trépano durante una biopsia quirúrgica o una biopsia diagnóstica, se extrae de manera estéril y posteriormente se corta en pequeños fragmentos. Se introducen en un tubo de molienda estéril precargado con $1\ \text{g}$ de perlas de alúmina de $1\ \text{mm}$ de diámetro. Se añaden $4\ \text{ml}$ de una solución $0,03\ \text{M}$ de Na_2CO_3 ($1\ \text{V}/1\ \text{V}$). Posteriormente, el tubo se pone en un triturador durante 3 minutos. Se repite la operación hasta obtener un material triturado líquido. La solución de trituración se transfiere a un tubo de centrifuga con una pipeta estéril.

b) Extracción de proteínas citoplasmáticas de la muestra de tumor

Se centrifuga una biopsia triturada a $6000\ \text{rpm}$ durante 5 minutos para eliminar los restos de membrana. El sobrenadante se almacena, se transfiere a un tubo de centrifuga estéril y se diluye al $50\ \%$ ($1\ \text{V}/1\ \text{V}$) en una solución sobresaturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, posteriormente se pone a 4°C durante $1\ \text{h}$ y finalmente se centrifuga a $6000\ \text{rpm}$ durante 30 minutos. El sedimento se resuspende en $1\ \text{ml}$ de una solución $0,02\ \text{M}$ de $(\text{Na}_2\text{HPO}_4; \text{NaH}_2\text{PO}_4)$ a $\text{pH } 6,8$ y posteriormente se diluye al $75\ \%$ ($1\ \text{V}/2,3\ \text{V}$) en la misma solución de sulfato amónico.

c) Paso de las proteínas de la etapa b) a través de una columna de cromatografía que contiene el polvo de HAP

El polvo preparado por el proceso del Ejemplo 1 se pone en una columna de cromatografía, cuyo extremo inferior está tapado. El contenido del tubo obtenido al final de la etapa b) se vierte en la columna de cromatografía y se pasa a través del polvo de hidroxiapatita (fosfato cálcico). Se tapa el extremo superior de la columna y posteriormente la columna se agita vigorosamente y posteriormente se deja reposar durante 3 minutos. Se coloca una jeringa llena de aire en el extremo superior de la columna, cuyo extremo inferior no está tapado. Se ejerce una presión lenta sobre el émbolo de la jeringa para hacer pasar todo el líquido a través de la columna de HAP en contacto con las proteínas de la muestra del tumor.

d) Lavado del polvo de la etapa c) o composición

Posteriormente, la columna se lava con un tampón fosfato o una solución de $\text{NaCl } 0,02\ \text{M}$ y $\text{pH } 6,8$.

e) *Suspensión de la composición*

Posteriormente, el tampón de fosfato se elimina por presión con la jeringa y posteriormente se reemplaza por la solución de inyección. Después de cerrar el extremo inferior de la columna de la etapa d), se introducen en la columna de HAP 4 ml de una solución para inyección que consiste en carboximetilcelulosa al 2 % en una solución de NaCl 0,02 M.

La columna de HAP cargada con proteínas específicas del tumor (biopsia) se cierra en ambos extremos y posteriormente se agita para suspender el polvo de HAP en el líquido de inyección.

Una vez que el polvo está en suspensión, la composición está lista para su uso. Bastará conectar jeringas de 1 ml para bombear 0,5 ml directamente a la columna e inyectar esta dosis al paciente a tratar.

Ejemplo 3: Kit que comprende polvo de HAP según la invención y su implementación

El kit debe permitir a un profesional de la medicina animal o humana purificar los péptidos específicos para el tumor de un paciente y esto mediante el contacto de los polvos de HAP según la invención y la muestra del tumor. Este polvo de HAP fijará estos péptidos específicos del tumor para posteriormente inyectarlos en el tejido por vía subcutánea o intradérmica.

Contenido del kit:

Concentración	Envase	Contenido en ml	Composición química	Designación
0,03 M	5 ml	4	Na ₂ CO ₃ o NaHCO ₃	I
saturación	10 ml	8	(NH ₄) ₂ SO ₄	II
0,02 M, pH 6,8	10 ml	8	Na ₂ HPO ₄ ; NaH ₂ PO ₄	III
2 % CMC ds NaCl 0,02 M	5 ml	4	CMC + NaCl	IV

Implementación del kit (procedimiento):

Se implementan las etapas del Ejemplo 2 anterior.

Este kit contiene el material estrictamente necesario para extraer las proteínas citoplasmáticas de una muestra de tumor, purificar las HSP celulares y fijarlas en los polvos de HAP y preparar la suspensión inyectable. Combina soluciones salinas de forma original para extraer las proteínas citoplasmáticas y un dispositivo cerrado que permite pasar, de forma estéril y bajo presión, una solución proteica a través de una columna cerrada que contiene un polvo según la invención, biocompatible e inyectable, lavar el polvo para eliminar las proteínas sin interés biológico, dispersar los polvos en una solución inyectable y cargar las jeringas sin abrir la columna. La no apertura de la columna es una ventaja considerable porque permite limitar los riesgos de contaminación.

El kit también contiene jeringas y agujas estériles de 1 ml. Etiquetas de pequeño y gran formato, tubos de centrifuga y recogida de muestras estériles.

Ejemplo 4: Efecto del polvo según la invención sobre la estimulación del inflammasoma

El inflammasoma es un complejo proteico oligomérico implicado en la inmunidad innata o inespecífica. Se forma tras el reconocimiento de varias señales inflamatorias (LPS, cristales de ácido úrico, diversos componentes víricos y bacterianos) por proteínas de la familia NLRP. El inflammasoma promueve la maduración de las citocinas inflamatorias IL-1 β e IL-18, escindiéndolas mediante la activación de su caspasa 1. El inflammasoma es responsable de la activación de los procesos inflamatorios y puede inducir un fenómeno de piroptosis, un programa de muerte celular diferente de la apoptosis. Aunque las citocinas inflamatorias sintetizadas a nivel tumoral pueden estar implicadas en el desarrollo del tumor, la activación del inflammasoma por los adyuvantes a distancia del tumor es fundamental para el cebado cruzado de linfocitos T y para el reclutamiento de APC.

Se ha probado la capacidad de varios polvos de HAP para estimular el inflammasoma. Los polvos se utilizan como segunda señal (después de un ligando (PMA) activo sobre los receptores TLR) y se ponen en contacto con células (THP1 de vivogen®) que producirán IL1b. El contacto se realiza durante 1 ^{1/2} h, 3 ^{1/2} h y 7 ^{1/2} h. Esta IL1b actuará sobre una segunda línea celular que tiene un gen de fosfatasa alcalina acoplado al factor de transcripción (NF-kB) sobre el que actúa la IL-1b. Después de la reacción con su sustrato, se mide la densidad óptica (DO) de la fosfatasa alcalina. La activación de la fosfatasa alcalina en este caso es un reflejo de la activación del sistema inmunológico implementada en el proceso antitumoral. Por tanto, existe una correlación entre la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina y la activación del inflammasoma (NLRP3).

La cantidad de fosfatasa alcalina se mide por espectrofotometría de acuerdo con métodos convencionales.

Se han probado polvos con las siguientes características.

Polvo	Cantidad de HAP (en %)	Forma de partículas de polvo	Tamaño de partículas (en μm)	Temperatura de sinterización para la preparación del polvo (en $^{\circ}\text{C}$)	Superficie específica (en m^2/g)
A	>98	irregular	0-25	900	2,9
B	>98	irregular	0-25	500	33,53
C	>98	esférica	80-125	1180	0,6
D	>98	irregular	80-160	1180	0,77
E	>98	esférica	22-45	1180	0,9
F	>98	esférica	0-25	600	31,11
G	>98	irregular	0-25	600	34,69
H	>98	acicular	0-25	0	10,11

- 5 La **Figura 2** ilustra la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina después de 1 $^{1/2}$ h de contacto del polvo con las células y en función de las diferentes dosis de polvo.

La **Figura 3** ilustra la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina después de 3 $^{1/2}$ h de contacto del polvo con las células y en función de las diferentes dosis de polvo.

- 10 La **Figura 4** ilustra la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina después de 7 $^{1/2}$ h de contacto del polvo con las células y en función de las diferentes dosis de polvo.

- 15 De los resultados se desprende que los polvos B, F y G permiten una mejor activación del inflammasoma, en particular con dosis entre 20 μl y 200 μl . Por tanto, estos polvos pueden intervenir en la activación del sistema inmunológico citotóxico a través del mecanismo antitumoral. Los polvos B, F y G tienen todas 3 características comunes, a saber, un tamaño de partícula de entre 0 y 25 μm , una superficie específica superior a 30 m^2/g y la sinterización se realiza a una temperatura de 500 $^{\circ}\text{C}$ y 600 $^{\circ}\text{C}$.

- 20 **Ejemplo 5: Efecto de las proteínas desorbidas de las partículas de vacuna preparadas según la invención y puestas en contacto con células RAW 264.7 (ATCC)**

- 25 Las proteínas de una vacuna preparada como se describe a partir de un osteosarcoma de perro se desorben de las partículas mediante una solución de K_2HPO_4 . Estas proteínas se marcan con una molécula de biotina utilizando sulfo-NHS-biotina. Posteriormente se ponen en contacto con las células RAW en cultivo después de que las cd91 hayan sido bloqueadas o no por anticuerpos anti-cd91. A continuación, las células se ponen en presencia de una estreptavidina marcada con peroxidasa y revelada por una diaminobencidina. El control positivo es un gp96 marcado y utilizado de la misma manera.

- 30 Parece que todas las células están marcadas por las proteínas purificadas de la vacuna, así como por la gp96. En ambos casos, el marcaje se inhibe poniendo en contacto las células de antemano con un anti cd91. Esto demuestra que las proteínas derivadas de la vacuna se unen a las células presentadoras de antígeno solo a través de los receptores cd91, que por lo tanto corresponderían a proteínas de choque térmico (HSP).

- 35 **Ejemplo 6: Efecto de la composición en el tratamiento del osteosarcoma en perros**

El osteosarcoma es una neoplasia ósea primaria. Se da preferentemente en huesos largos. Los perros con osteosarcoma tienen un pronóstico de vida muy precario. La supervivencia media es de aproximadamente 2 meses. La amputación y la quimioterapia dan mejores resultados, pero no siempre son posibles.

- 40 Sabiendo que las proteínas de choque térmico pueden asociarse con péptidos sintetizados por células cancerosas y activar el sistema inmunológico (vía linfocitos T y en particular CD8), en perros sanos que padecen osteosarcoma se ha probado un método de vacunación basado en la inyección de polvos según la invención que llevan proteínas específicas del tumor del perro (estas son principalmente proteínas de choque térmico asociadas con péptidos tumorales). Se midió si la vacunación con estos polvos podría tener un efecto clínico en estos perros sanos y

- 45 patológicos. Según el método descrito en el Ejemplo 2, se adsorbieron proteínas tumorales de biopsias de perros que padecían osteosarcoma sobre un polvo de HAP según la invención. Se administraron ocho inyecciones a perros en diferentes intervalos de tiempo. Después de esta autovacuna, se midió la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión del osteosarcoma en cada perro y se compararon con los datos de la bibliografía.

No se han demostrado efectos secundarios locales o sistémicos en perros después de la inyección. Se observa que la tasa de supervivencia general en todos los perros que recibieron una inyección (sanos o que padecen

osteosarcoma) es mejor que la supervivencia general promedio de los perros reportada en la bibliografía.

También se ha demostrado que la supervivencia libre de progresión está muy cerca de la supervivencia general y que el área de inflamación en el área del tumor retrocede después de cada inyección.

En las radiografías se observa una remodelación de la región del tumor después de la vacunación.

Estos resultados muestran que las autovacunas con el HAP en polvo según la invención cargado con proteínas de choque térmico de un tumor de perro (composición según la invención) representan una buena terapia adyuvante para eliminar las células diseminadas durante la evolución de un tumor o cáncer y/o ralentizar el desarrollo de metástasis.

Ejemplo 7: Efecto de la composición frente a quimioterapia en el tratamiento del osteosarcoma en perros

Se dividieron 22 perros con osteosarcomas en 3 grupos diferentes correspondientes a tres tratamientos diferentes:

- un primer grupo de perros (5 perros) no recibe tratamiento,
- un segundo grupo de perros (10 perros) recibe quimioterapia sola según lo publicado en la bibliografía (Takuo Shida et al. Low-dose chemotherapy for canine appendicular osteosarcoma, Journal of Japan Veterinary Cancer Society, vol.2, No.1, 1-6 2011)
- un tercer grupo de perros (7 perros) se vacuna con la composición según la invención obtenida al final del Ejemplo 2 (polvo de hidroxipatita que lleva proteínas citoplasmáticas del tumor de perro a tratar).

Se observó la supervivencia global en días de todos los perros de este estudio.

La **Figura 5** ilustra estos resultados de supervivencia para perros no tratados/perros sometidos a quimioterapia/perros vacunados con la composición según la invención.

Los perros no tratados tienen una supervivencia de aproximadamente 250 días, mientras que los perros tratados con quimioterapia tienen una supervivencia de aproximadamente 580 días y los perros tratados con inmunoterapia tienen una supervivencia general de aproximadamente 450 días. Esto muestra que la inmunoterapia con la composición según la invención da resultados muy satisfactorios y comparables a los resultados obtenidos con la quimioterapia, aunque tiene menos inconvenientes que la quimioterapia que es muy restrictiva y tiene muchos efectos secundarios. No se observó ningún efecto secundario en perros tratados con inmunoterapia con la composición según la invención.

Ejemplo 8: Efecto de la composición según la invención en el tratamiento de linfomas B en perros

El linfoma es un cáncer del sistema linfático que se desarrolla a expensas de los linfocitos. Se caracteriza por un crecimiento excesivo de células malignas en órganos linfoides secundarios. Entre los linfomas malignos agresivos se encuentran los linfomas de fenotipo B y de fenotipo T, también llamados linfomas B y T.

Se realizó un estudio del efecto de la composición según la invención sobre los linfomas en 50 perros que padecían linfomas B histológicamente comprobados.

Los perros se han tipificado de acuerdo con los patrones de la OMS:

- Etapa I: afectación de un ganglio o un órgano.
- Etapa II: afectación regional de varios ganglios linfáticos con o sin amígdalas;
- Etapa III: poliadenomegalia;
- Etapa IV: afectación del hígado y/o el bazo además de las etapas I a III;
- Etapa V: daño a la médula ósea y la sangre además de las etapas I a IV.

También se evalúan las subetapas (a) correspondientes a ausencia de signos clínicos y (b) con signos clínicos.

Se extrae un ganglio linfático de un perro con linfoma B y se preparan las dosis de inmunoterapia según el protocolo mencionado anteriormente con el método de preparación de la composición y el kit de vacunación (véanse los ejemplos 1 a 4).

Se inyecta una dosis por vía subcutánea una vez a la semana durante 4 semanas y posteriormente una vez al mes durante 4 meses. Por tanto, se utilizan 8 dosis.

Se formaron dos grupos de perros:

- a. el primer grupo recibió estas dosis de inmunoterapia asociadas a un protocolo de quimioterapia que incluía asparaginasa, vincristina, adriblastina, ciclofosfamida, lomustina y prednisona;

b. el segundo grupo recibió solo dosis de inmunoterapia.

Estos diferentes datos se compararon posteriormente con los datos de la bibliografía.

- 5 Los perros (n = 16) en una etapa muy avanzada (Va o Vb) están en riesgo porque su esperanza de vida es muy corta. Los datos de la bibliografía y los datos experimentales dan los siguientes resultados:

	Supervivencia mediana (en días)	Supervivencia promedio (en días)
Perros en etapa V (a o b) no tratados	7	43
Perros en etapa V (a o b) bajo quimioterapia	36	93
Perros en etapa V (a o b) con más del 30 % de cordón infiltrado, sin tratar	4	4
Perros en etapa V (a o b) con un 30 % de médula infiltrada bajo quimioterapia	21	30
Perros en etapa V (a o b) en quimioterapia y vacunados con el fármaco según la invención (grupo 1)	> 210	> 225
Perros en etapa V (a o b) vacunados con el fármaco según la invención (grupo 2)	160	208

- 10 Así, para el grupo 1 (inmunoterapia según la invención combinada con quimioterapia), los datos obtenidos son mucho más alentadores que los obtenidos en la bibliografía sin vacunación (mediana a los 36 días y media a los 93 días).

- 15 A nivel clínico, los perros del grupo que recibió quimioterapia e inmunoterapia permanecieron en remisión completa todo el tiempo del experimento y los que recibieron inmunoterapia sola mantuvieron un estado estable hasta que se reanudó la enfermedad y requirió su eutanasia.

En total, la inmunoterapia combinada o no con quimioterapia proporciona una esperanza de vida significativamente mayor que cuando no se usa. No se observaron efectos secundarios.

20 **Ejemplo 9: Efecto de la combinación de fármacos según la invención en el tratamiento de linfomas B en perros**

- 25 Se realizó un estudio del efecto de la composición según la invención sobre los linfomas en 50 perros que padecían linfomas B histológicamente comprobados.

Los perros se han tipificado de acuerdo con los patrones de la OMS:

- 30
- Etapa I: afectación de un ganglio o un órgano.
 - Etapa II: afectación regional de varios ganglios linfáticos con o sin amígdalas;
 - Etapa III: poliadenomegalia;
 - Etapa IV: afectación del hígado y/o el bazo además de las etapas I a III;
 - Etapa V: daño a la médula ósea y la sangre además de las etapas I a IV.

- 35 También se evalúan las subetapas (a) equivalentes a ausencia de signos clínicos y (b) con signos clínicos.

Se extrae un ganglio linfático de un perro con linfoma B y se preparan las dosis de inmunoterapia según el protocolo mencionado anteriormente con el proceso de preparación de la composición y el kit de vacunación (véanse los Ejemplos 1 a 4).

- 40 Una dosis preparada según el Ejemplo 2 se inyecta por vía subcutánea una vez a la semana durante 4 semanas y posteriormente una vez al mes durante 4 meses. Por tanto, se utilizan 8 dosis. La vacuna se prepara a partir de una biopsia quirúrgica de ganglios linfáticos.

Se formaron tres grupos de perros:

- 45
- un primer grupo para el que estas dosis se asociaron a un protocolo de quimioterapia que incluía asparaginasa, vincristina, adriblastina, ciclofosfamida, lomustina y prednisona administradas de acuerdo con el protocolo ilustrado en la **Figura 7**,
 - un segundo grupo recibió quimioterapia y solo dosis de placebo que no contenían proteínas autólogas (composición según la invención),
- 50

A T0 y al final del tratamiento, se realizó una inyección intradérmica (0,1 ml) de extracto de tumor autólogo para comprobar si se producía una reacción de hipersensibilidad retardada (48-72h).

- un tercer grupo recibió solo las dosis de la vacuna.

La **Figura 6** ilustra los resultados del estudio. Estas son tres curvas que muestran la supervivencia en días y el porcentaje de supervivencia de los perros con linfoma B tratados con la autovacuna según la presente invención sola (-▲-), de los perros tratados con la autovacuna según la presente invención en combinación con quimioterapia (-◆-) y de los perros tratados con un placebo en combinación con quimioterapia (-■-).

Las curvas de supervivencia muestran una supervivencia aumentada muy significativamente cuando los perros reciben un tratamiento que combina quimioterapia e inmunoterapia (la composición según la invención) en comparación con los que reciben únicamente las dosis de quimioterapia. El grupo que recibe inmunoterapia solo tiene una supervivencia comparable a la que recibe quimioterapia sola.

En total, la inmunoterapia combinada o no con quimioterapia proporciona una esperanza de vida significativamente mayor que cuando no se usa. No se observaron efectos secundarios.

Estos resultados sugieren que esta técnica de estimulación del sistema inmunológico es eficaz y podría ser de gran interés en seres humanos en combinación con el tratamiento de quimio/radioterapia.

Durante la recaída, los perros recibieron la denominada quimioterapia de rescate idéntica. Tres de ellos también recibieron una revacunación con vacunas hechas a partir de la biopsia inicial, mientras que otros 4 perros recibieron una revacunación con una vacuna hecha a partir de una nueva biopsia realizada en la recaída. Ambos grupos tuvieron una mayor supervivencia que los perros que recibieron quimioterapia de rescate sola. El grupo de perros vacunados a partir de la nueva biopsia tiene una supervivencia más prolongada que los perros vacunados a partir de la biopsia inicial. Por tanto, existe interés en la recaída para fabricar una nueva vacuna a partir de una nueva biopsia.

Ejemplo 10: Efecto del uso de la composición en el tratamiento del melanoma en caballos

Los melanomas equinos son mucho más comunes en caballos tordos y blancos que en caballos de pelaje oscuro. Ciertas razas están particularmente expuestas, como el caballo de la Camarga, que tiene una prevalencia de casi el 70 % después de 15 años.

Las localizaciones más habituales y típicas de estos tumores son la cara ventral de la cola (94 % de los casos en el caballo de la Camarga), el perineo (43 %) y los genitales externos.

Un estudio muy interesante de Seltenhammer et al. sobre 296 caballos tordos (Lipizzan) mostró que 148 de ellos manifestaban melanomas dérmicos (50 %). De los 68 mayores de 15 años, 51 tenían melanoma. En el 75 % de los casos se detectaron melanomas debajo de la cola.

Podemos distinguir varios tipos de evolución de estos tumores:

- crecimiento lento durante muchos años (hasta 20 años) sin metástasis;
- crecimiento lento durante varios años seguido de un crecimiento repentino rápido y transformación maligna;
- crecimiento rápido y maligno desde el principio.

No existe un tratamiento real para estos tumores que no sea la resección quirúrgica, que a menudo es difícil por su localización, su multiplicidad y su recidiva casi sistemática.

No es posible prever ninguna quimioterapia en caballos debido a la baja relación beneficio/riesgo y las limitaciones técnicas que esto generaría. La composición según la invención tal como se describe para la estimulación del sistema inmunológico frente a proteínas anormales sintetizadas por células tumorales mediante la composición según la invención y como se describe en el ejemplo 2 es una alternativa interesante, y más aún porque tiene pocos o ningún efecto secundario. Además, la implementación es compatible con mantener al animal en su entorno habitual.

Las proteínas anormales de las células cancerosas del melanoma del caballo se adsorbieron sobre un polvo de hidroxapatita según la técnica descrita en el ejemplo 2 (adyuvante mineral de vacunación) con el kit descrito con el fin de estimular el sistema inmunológico del animal a partir del cual se aislaron las células cancerosas.

Se seleccionó un tumor ovoide del caballo como control porque es fácilmente medible.

La vacuna consiste en una inyección de 0,5 ml de la composición (polvo de hidroxapatita cargada con proteínas específicas del tumor del caballo) en el tejido subcutáneo cada semana durante 1 mes y cada mes durante 4 meses, lo que hace un total de 8 inyecciones.

No se observaron efectos secundarios, ni locales ni sistémicos, habiendo permanecido el caballo en el campo

durante toda la duración del tratamiento y habiendo tenido una actividad normal.

El volumen tumoral calculado a partir de las mediciones realizadas se ha reducido en un 70 % en poco menos de 3 meses.

5 Este estudio muestra que este método de tratamiento descrito en el presente documento es eficaz en el melanoma equino y permite una regresión del tamaño del tumor. Se puede considerar la remisión total.

10 **Ejemplo 11: Efecto de la reutilización de la composición durante una recidiva de linfoma B después de la remisión completa**

En una serie de 5 perros que en diferentes momentos sufrieron una recidiva de su linfoma B después de una remisión clínica y biológica completa, manifestada por una reaparición de ganglios palpables y un agrandamiento de los tumores de varios órganos identificados en la evaluación inicial de extensión o ante la reaparición de una invasión de la médula espinal, se repitió un tratamiento según la invención utilizando una biopsia de ganglio linfático inicial o se obtuvo después de la recidiva. Se diferenciaron dos grupos: un grupo que recibió quimioterapia más tratamiento según la invención y que volvió a ser tratado según la invención tras la recidiva con la biopsia inicial (I), un segundo grupo que recibió quimioterapia más tratamiento según la invención y que volvió a ser tratado según la invención después de la recidiva con la segunda biopsia (post-recidiva) (II). La supervivencia después de la recidiva de estos dos grupos se comparó con la de los perros placebo tratados con un nuevo ciclo de quimioterapia después de la recidiva (T). Parece que la supervivencia de los dos grupos analizados (I y II) es mayor que la del grupo T y que la supervivencia del grupo II es mayor que la del grupo I. Por tanto, de nuevo existe la ventaja de ser tratado según la invención después de la recidiva de la enfermedad y, si es posible, de una nueva biopsia.

25 **Ejemplo 12: Síntesis de interferón gamma por linfocitos T estimulados por células dendríticas activadas *in vitro* por el polvo utilizado según la invención**

El kit según la invención se utilizó para purificar proteínas de un tumor obtenido trasplantando células RT-4T1 en ratones balb/c. Las células dendríticas de estos ratones se obtienen a partir de macrófagos cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF. A los cinco días de cultivo, estas células se ponen en presencia de cantidades variables de solución para 10^6 células durante 48 horas. A continuación, estas células se ponen en contacto con linfocitos T de la misma línea de ratón, el interferón gamma sintetizado por estas células se analiza mediante la prueba de Elisa. A partir de 20 μ l de solución de 10^6 células, hay una síntesis significativa de interferón gamma en comparación con el control negativo.

35

REIVINDICACIONES

1. Composición para uso como autovacuna antitumoral para el tratamiento de linfomas B o T en un sujeto, que comprende un polvo de hidroxiapatita y/o de fosfato tricálcico sobre el que se absorben proteínas citoplasmáticas de una muestra de tumor del sujeto, dicho polvo que tiene una superficie específica $SS \geq 30 \text{ m}^2/\text{g}$ y un tamaño de partícula $G \leq 200 \text{ }\mu\text{m}$.
5
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el polvo se ha sometido a una etapa de sinterización comprendida entre 400 y 600 °C.
10
3. Composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el polvo tiene un tamaño de partícula $G \leq 25 \text{ }\mu\text{m}$.
15
4. Composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el polvo tiene un tamaño de partícula G comprendido entre 25 μm y 45 μm .
20
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el espectro de difracción de rayos X del polvo tiene una relación entre la anchura a media altura sobre la altura total de la línea en un espectro de difracción de rayos X, con un valor de ángulo de 2θ igual a 31,773 grados $\pm 1 \%$, expresado como porcentaje, comprendido entre el 0,2 % y el 0,35 %.
25
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el polvo está suspendido en un líquido de inyección.
30
7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el sujeto es un ser humano.
35
8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el sujeto es un perro.
9. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso terapéutico en combinación con un agente antitumoral y/o un agente radioterapéutico.
10. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada por que** una dosis administrada mediante inyección al sujeto comprende entre 30 mg y 50 mg de hidroxiapatita y entre 1000 μg y 2000 μg de proteínas.

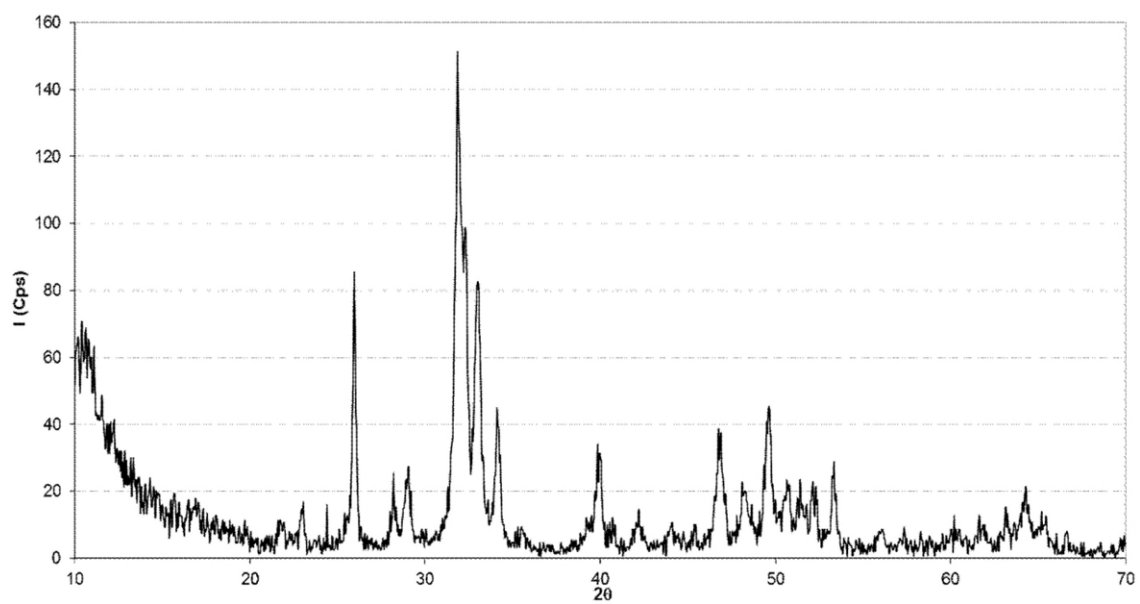


Figura 1

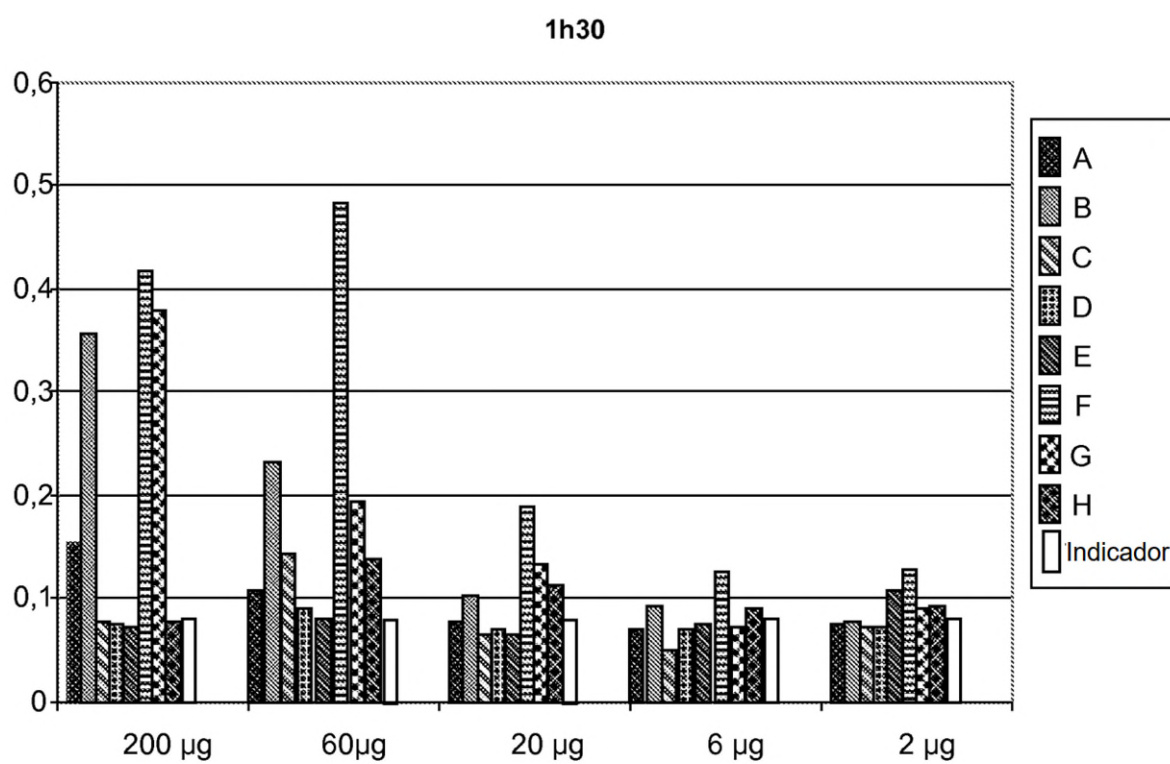


Figura 2

Figura 3

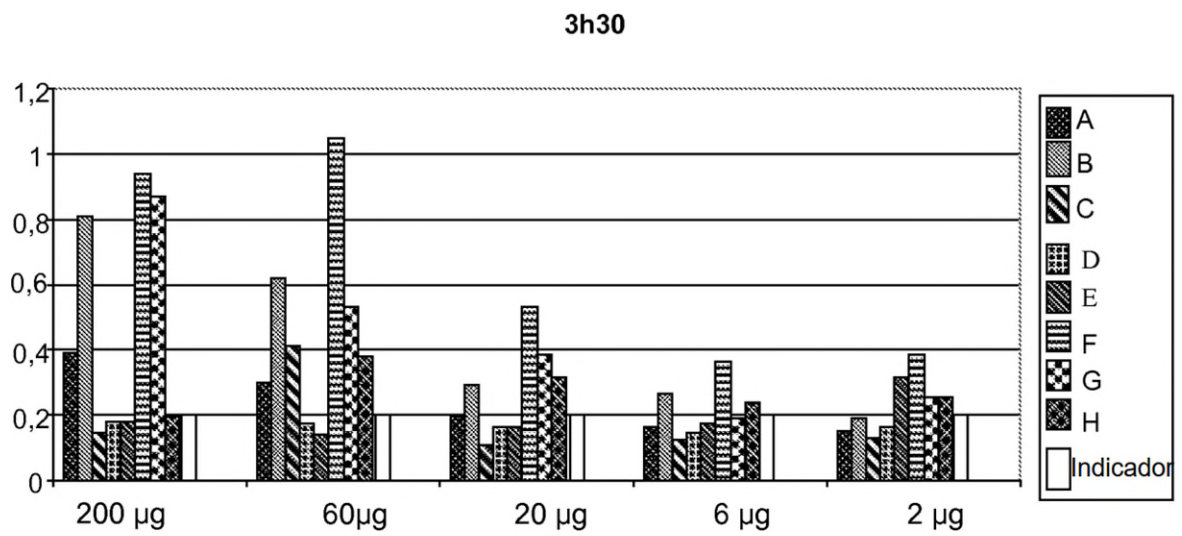


Figura 4

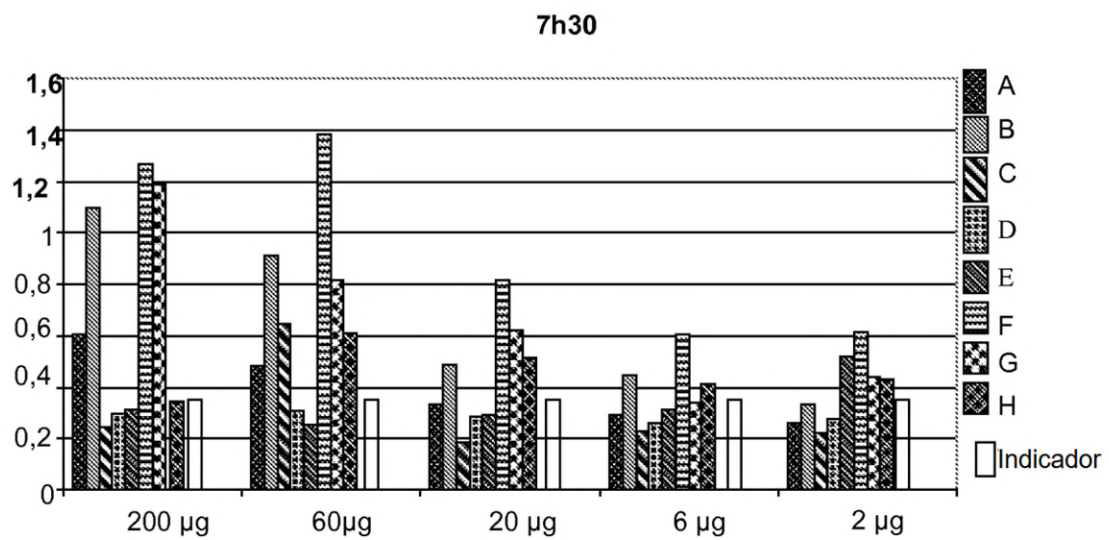


Figura 5

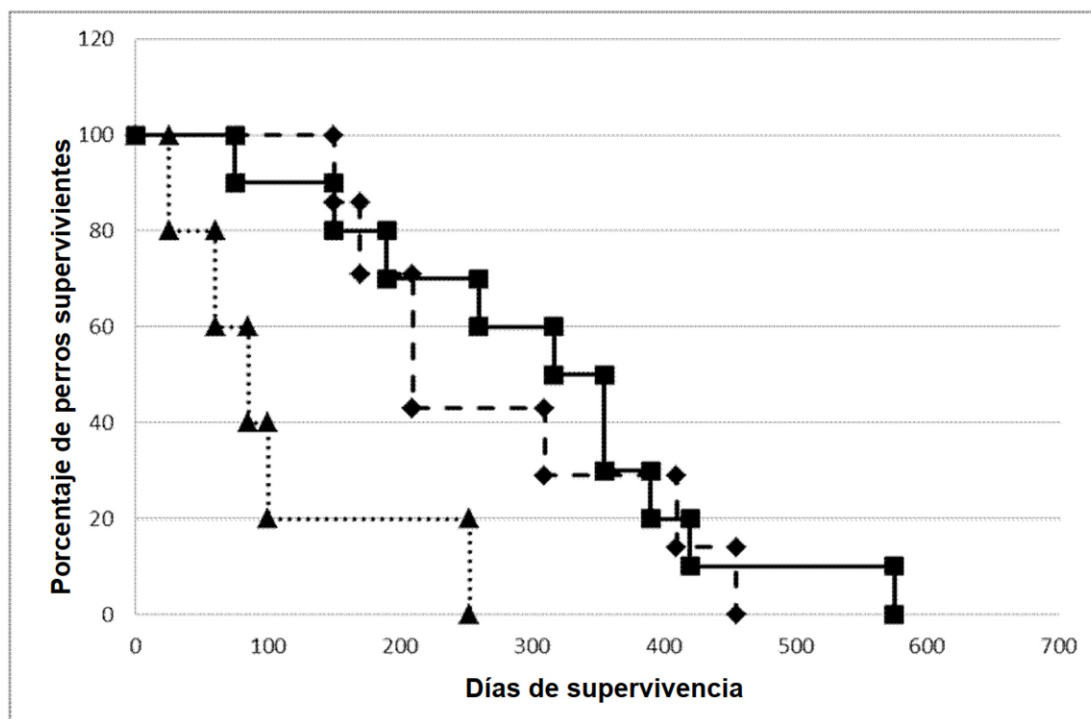


Figura 6:

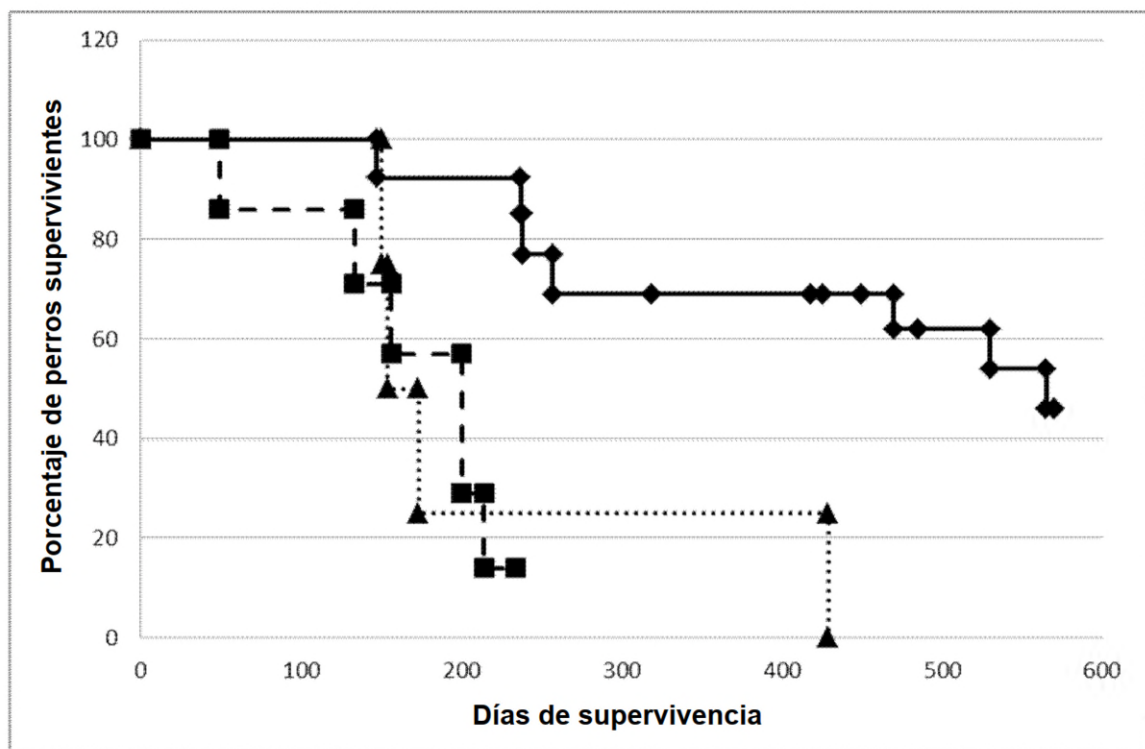


Figura 7

semana					
1	Asp				
2		Vinc	Ciclo		
3		Vinc			
X4		Vinc			
X5					
X6					
X7				Adri	
8					
9					
10				Lomu	
11					
X12					
13		Vinc	Ciclo		
14					
15					
X16				Adri	
17					
18					
19				Lomu	
X20					
21					
22					
23					
X24					

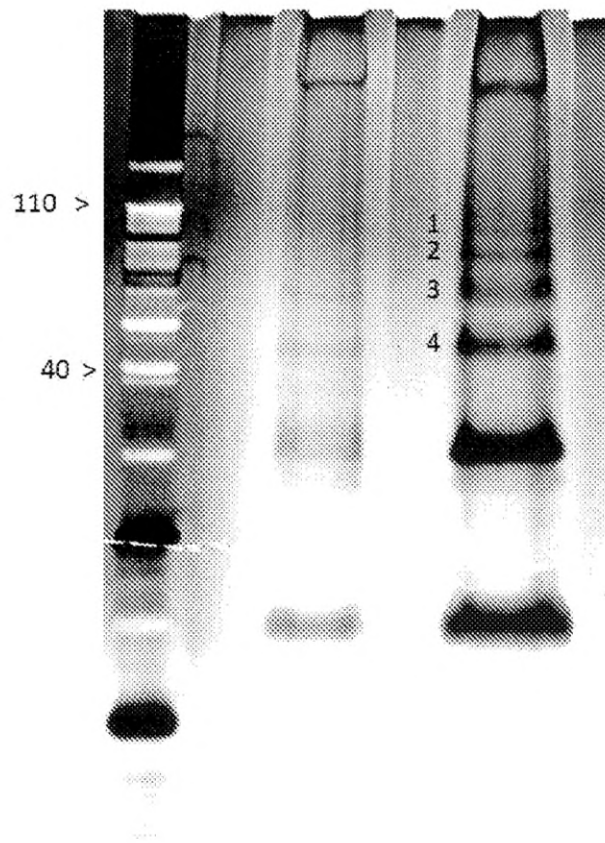


Figura 8