República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0208675-1 B1

(22) Data do Depósito: 08/04/2002

(45) Data de Concessão: 13/03/2018

(54) Título: COMBINAÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA PARA A IMUNOTERAPIA DE TUMORES QUE SUPEREXPRESSAM GANGLIOSÍDEOS, USO DA MESMA, E, USO DE UM MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO E/OU A PROLIFERAÇÃO DE TUMORES QUE SUPEREXPRESSAM GANGLIOSÍDEOS

(51) Int.Cl.: A61K 31/7032; A61K 39/00; A61P 35/00

(30) Prioridade Unionista: 06/04/2001 CU 84/2001

(73) Titular(es): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

(72) Inventor(es): LUIS ENRIQUE FERNÁNDEZ MOLINA; ANA MARÍA VÁZQUEZ LÓPEZ; ROLANDO PEREZ RODRIQUEZ; ALEXIS PÉREZ GONZÁLEZ; ADRIANA CARR PÉREZ; YILDIAN DÍAS RODRÍGUÉZ; MAURO A. ALFONSO FERNÁNDEZ

“COMBINAÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA PARA A IMUNOTERAPIA DE TUMORES QUE SUPEREXPRESSAM GANGLIOSÍDEOS, USO DA MESMA, E, USO DE UM MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO E/OU DA PROLIFERAÇÃO DE TUMORES QUE SUPEREXPRESSAM GANGLIOSÍDEOS”

Campo técnico

[0001] A presente invenção refere-se à medicina humana, especificamente às vacinas terapêuticas que induzem uma resposta imune contra tumores que superexpressam gangliosídeos.

Técnica anterior

[0002] Os gangliosídeos são componentes normais das membranas plasmáticas da maioria das células dos mamíferos. Embora estes glicoesfingolipídeos sejam expressados em tecidos normais, eles são alvos muito atraentes para a imunoterapia devido às mudanças que ocorrem em seus padrões de expressão durante a transformação oncogênica das células (Hakomori, S. Ann. Rev. Biochem. 50; 1981:733-764; Hakomori, Cancer Res. 45; 1985:2405-2414; Irie RF, e col. em: Therapeutic monoclonal antibodies. Borrebaeck CAK, e Larrick JW (Eds.). M. Stockton Press, 1990, pp. 75-94).

[0003] Os gangliosídeos resultam muito pouco imunogênicos tanto por serem antígenos próprios quanto por sua natureza sacarídica. Algumas estratégias, que têm sido exploradas para incrementar a imunogenicidade destes antígenos, baseiam-se em sua apresentação ao sistema imune em um ambiente molecular diferente. Uma destas estratégias tem sido o uso de vacinas conjugadas consistentes em uma ligação covalente do antígeno sacarídico em proteínas transportadoras T dependentes muito imunogênicas, o que tem permitido a obtenção de respostas de anticorpos de duração relativamente larga contra certos gangliosídeos e a geração de anticorpos IgG, embora os títulos desta resposta de anticorpos depois das reimunizações tenham sido menores em

comparação com as obtidas em resposta aos antígenos timo dependentes clássicos (Helling, F e col. Cancer Res. 54; 1994:197-203; Helling, F e col. Cancer Res. 55; 1995:2783-2788; Livingston PO e col. Cancer Immunol. Immunother. 45; 1997:10-19).

[0004] Têm sido relatadas novas composições de vacinas que induzem uma resposta imune contra gangliosídeos N-acetilados e N-glicolilados. Estas vacinas baseiam-se na conjugação hidrofóbica dos gangliosídeos com proteolipossomas de tamanho muito pequeno (VSSP, sigla em inglês) conformados pelo complexo de proteínas da membrana externa da *Neisseria meningitidis* (gangliosídeos/VSSP) (Estévez F. e col. Vaccine 18; 1999:190-197; Patentes US 5.877.985 e US 6.149.921). Tem sido demonstrado que as vacinas compostas por gangliosídeo GM3/VSSP ou o gangliosídeo N-glicolil GM3 (NeuGcGM3)/VSSP produzem títulos consistentemente altos de anticorpos IgM e IgG específicos contra GM3 e NeuGcGM3. A administração da vacina GM3/VSSP incrementa significativamente a sobrevida de ratos portadores de melanoma B16, diminui os volumes tumorais e incrementa a capacidade de impedir a implantação cutânea deste tumor (Alonso e col. Int. J. Oncology 15; 1999:59-66; Carr A. e col. Melanoma Research (aceito para publicar).

[0005] A teoria da rede idiotípica proposta por Jerne 1974 (Jerne, N.K. Ann. Immunol. 125C; 1974:373-389), concebia o sistema imune como uma rede de anticorpos que podiam interagir entre eles e com um grande número de antígenos naturais, por meio de suas regiões variáveis ou idiotipos (Id), e que por intermédio desta interação entre idiotipo-anti-Id se regularia o sistema imune. A partir do surgimento desta teoria se abriram novas estratégias para a imunoterapia ativa do câncer baseadas no uso de vacinas anti-idiotipo, donde a vacinação se realiza com o anticorpo que reconhece o antígeno tumoral (Ab1) e que por sua vez induz a geração dentro do organismo de anticorpos anti-idiotipos (Ab2) e estes por sua vez imitam funcionalmente o antígeno nominal e geram

resposta de anticorpos anti-anti-idiotipos (Ab3) contra o antígeno tumoral (Schmolling J, e col. Hybridoma 14; 1995:183-186).

[0006] Por outra parte, têm sido relatados muitos exemplos de vacinas que contêm anticorpos anti-idiotipos, anti-Id ou (Ab2), capazes de induzir respostas imunes contra antígenos tumor-associados (Raychauhuri, S. e col. J. Immunol. 137; 1986:1743-1749; Raychauhuri, S. e col. J. Immunol. 139; 1987:3902-3910; Bhattacharya-Chatterjee, M. e col. J. Immunol. 139; 1987:1354-1360; Bhattacharya-Chatterjee, M. e col. J. Immunol. 141; 1988:1398-1403; Herlyn, D. e col. Intern. Rev. Immunol. 4; 1989:347-357; Chen, Z-J. e col. Cell. Imm. Immunother. Cancer; 1990:351-359; Herlyn, D. e col. In Vivo 5; 1991:615-624; Furuya, A. e col. Anticancer Res. 12; 1992:27-32; Mittelman, A. e col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 1992:466-470; Durrant, LG. e col. Cancer Res. 54; 1994:4837-4840; Mittelman, A. e col. Cancer Res. 54; 1994:415-421; Schmitt,H. e col. Hybridoma 13; 1994:389-396; Chakrobarty, M. e col. J. Immunother. 18; 1995:95-103; Chakrobarty, M. e col.. Cancer Res. 55; 1995:1525-1530; Foon, KA. e col. Clin. Cancer Res. 1; 1995:1285-1294; Herlyn, D. e col. Hybridoma 14; 1995:159-166; Sclebusch, H. e col. Hybridoma 14; 1995:167-174; Herlyn, D. e col. Cancer Immunol. Immunother. 43; 1996:65-76).

[0007] Outra idéia alternativa para induzir anticorpos contra gangliosídeos que inclui o uso de anticorpos Ab2, é a estratégia que explora a possibilidade de que um epitopo de natureza sacarídica possa ser representado por um epitopo proteico na molécula de anticorpo, tornando-o mais imunogênico. Efetivamente, anticorpos anti-Id que mimetizam gangliosídeos altamente expressados em células tumorais como GM3, GD3 e GD2, têm sido obtidos (Yamamoto, S. e col. J. Natl. Cancer Inst. 82; 1990:1757-1760; Chapman, P.B. e col. J. Clin. Invest 88; 1991:186-192; Cheung N-K V. e col. Int. J. Cancer 54; 1993:499-505; Saleh MN. e col. K. Immumol. 151; 1993:3390-3398; Sem G. e col. I.

Immunotherapy 21: 1998:75-83).

[0008] Resultados promissores têm sido obtidos em ensaios clínicos nos quais alguns destes anticorpos monoclonais (AcMs Ab2) têm sido utilizados juntamente com BCG ou QS2 como adjuvantes para tratar pacientes com câncer (McCaffery M. e col. Clin. Cancer Res. 2; 1996:679-686; Foon KA. e col. Clin Cancer Res. 4; 1998:1117-1124).

[0009] Do estado da técnica é conhecido se conhece um AcM denominado P3 (com Número de Depósito ECACC 94113026), o qual tem a característica particular de reconhecer especificamente o ácido siálico N-glicolilado em monosialo- e disialogangliosídeos. Este AcM Ab1 reconhece antígenos presentes nos tumores de mama e melanomas humanos. (Patente US 5.788.985; Vázquez A. M. e col. Hybridoma 14; 1995:551-556; Moreno E. e col. Glycobiology 8; 1998:695-705; Marquina G. e col. Cancer Res. 56; 1996:5165-5171; Carr A. e col. Hybridoma 19(3); 2000:241-247).

[00010] A partir de AcM P3 se obtém um AcM anti-idiotipo do tipo gama (sem imagem interna), identificado como 1E10 (Número de Depósito ECACC 97112901), capaz de produzir efeito anti-tumoral contra tumores murinos de mama e melanoma (Patente US 6.063.379; Vázquez e col. Hybridoma 14; 1995:183-186; Vázquez e col. Oncology Reports 7; 2000:751-756).

[00011] No estado da técnica não há antecedentes do uso combinado de vacinas que contêm gangliosídeos com composições farmacêuticas que contêm anticorpos anti-gangliosídeos (Ab1) ou anti-idiotipos (Ab2) ou versões recombinantes (anticorpos quiméricos ou humanizados) de citados anticorpos (denominadas vacinas idiotípicas); nem o uso de combinações de vacinas idiotípicas Ab1 com vacinas idiotípicas Ab2.

[00012] A presente invenção engloba o uso de todas as possíveis combinações das vacinas antes descritas, com o objetivo de potencializar o efeito que produzem cada uma delas em separado.

Descrição detalhada da invenção:

[00013] A presente invenção descreve uma composição farmacêutica, ou combinação de composições farmacêuticas, para a imunoterapia de tumores que superexpressam gangliosídeos, e que contêm pelo menos dois dos componentes mencionados a seguir:

(A) Uma vacina idiotípica cujo princípio ativo é um anticorpo anti-gangliosídeo (Ab1);

(B) Uma vacina idiotípica cujo princípio ativo é um anticorpo anti-idiotipo (Ab2) específico contra um anticorpo anti-gangliosídeo; e

(C) Uma vacina cujo princípio ativo é um gangliosídeo.

[00014] A citada composição farmacêutica, ou combinação de composições farmacêuticas pode conter A e B, ou A e C, ou B e C.

[00015] Preferivelmente a invenção se refere àquela composição farmacêutica, ou combinação de composições farmacêuticas, na qual A pode ser uma vacina idiotípica cujo princípio ativo é o anticorpo murino anti-gangliosídeo P3 depositado com o Número de Depósito ECACC 94113026; e na qual B pode ser uma vacina idiotípica cujo princípio ativo é o anticorpo anti-idiotipo murino 1E10 depositado com Número de Depósito ECACC 97112901 e na qual C pode ser uma vacina cujo princípio ativo é os gangliosídeos N-glicolil GM3 (NeuGcGM3) ou N-acetil GM3 (NeuAcGM3).

[00016] Todavia mais preferível é quando na composição farmacêutica, ou combinação de composições farmacêuticas da invenção os componentes A e B, ou A e C, ou B e C, se administram de forma simultânea ou alternada.

[00017] A composição farmacêutica, ou combinação de composições farmacêuticas descritas na presente invenção podem ser usadas para o tratamento de tumores que superexpressam gangliosídeos. Preferivelmente no tratamento de câncer de mama, de pulmão, do sistema

digestivo, do sistema urogenital, melanomas, sarcomas e tumores de origem neuroectodérmica.

[00018] Na presente invenção também é descrito um método que compreende a administração a mamíferos da composição farmacêutica, ou da combinação de composições farmacêuticas descritas anteriormente para a prevenção ou o tratamento de câncer de mama, de pulmão, do sistema digestivo, do sistema urogenital, melanomas, sarcomas e tumores de origem neuroectodérmica.

1. Preparação de vacinas que contêm gangliosídeos:

[00019] A preparação de vacinas que contêm como antígeno um ou mais gangliosídeos é realizada como descrita por Estévez e col. em Vaccine 18, 1999:190-197 e nas Patentes US 5.788.985 e US 6.149.921, nas quais os gangliosídeos naturais ou sintéticos são usados como componentes de proteolipossomas conformados pelo complexo proteico da membrana externa de *Neisseria meningitidis* (siglas em inglês, VSSP-G). Os citados gangliosídeos podem ser (NeuGcGM), GD3 ou (NeuAcGM).

2. Preparação de vacinas idiotípicas:

[00020] As composições farmacêuticas são preparada como descritas nas Patentes US 5.817.513 e US 6.063.379, nas quais as citadas vacinas contêm como princípio ativo os anticorpos monoclonais (AcM) murinos anti-ganglicosídeos tais como o AcM P3 (Número de Depósito ECACC 94113026) ou os AcM murinos anti-idiotipos tal como o AcM 1E10 (Número de Depósito ECACC 97112901) que reconhecem os anticorpos monoclonais anti-gangliosídeos.

3. Combinações imunoterapêuticas que provocam uma potencialização da resposta imunológica e do efeito anti-tumoral entre vacinas que contêm os gangliosídeos e vacinas idiotípicas, ou entre estas últimas, em modelos animais:

[00021] Os procedimentos referidos podem ser utilizados em ratos ou

em outras espécies de mamíferos, podendo-se incluir todas as variantes de combinações dos diferentes componentes antes mencionados. Os animais são imunizados com 3 a 10 doses em uma faixa de 25 μg a 1 mg de AcM murino que reconhece o gangliosídeo, com um intervalo entre as doses que oscila entre 7 e 14 dias. Durante este período de imunização os animais recebem entre 3 e 10 doses em uma faixa de 60 a 1.000 μg de vacina que contém o gangliosídeo, com um intervalo de tempo entre as doses de 7 a 14 dias.

[00022] Outra combinação imunoterapêutica é na qual os animais recebem entre 3 e 10 doses em uma faixa de 25 Mg a 1 mg de um AcM anti-idiotipo específico contra um anticorpo anti-gangliosídeo, com um tempo entre cada dose que oscila de 7 a 14 dias. Durante este período de imunização os animais recebem entre 3 e 10 doses em uma faixa de 60 a 1.000 μg de vacina que contém o gangliosídeo, com um intervalo de tempo entre as doses de 7 a 14 dias.

[00023] A administração de ambos os tipos de vacinas pode ser simultânea ou alternada. As vacinas podem ser formuladas como produtos separados ou dentro de uma mesma formulação de vacina para a situação na qual são administradas de forma simultânea. No caso de a administração ser alternada, os animais recebem as vacinas em intervalos de 3-7 dias entre um tipo de vacina e outro tipo de vacina.

[00024] As vacinas são administradas em um adjuvante que pode ser alumina (62,5 μg - 2,5 mg), Montanide ISA 51 (0,1 - 1,2 mL/dose), um outro apropriado. O volume total de uma dose é de 10 μL a 2 mL.

[00025] As vacinas que contêm um ou mais dos gangliosídeos podem ser administradas por via intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intramucosal ou combinações destas. As vacinas que contêm os anticorpos podem ser administradas por estas mesmas vias.

[00026] A administração das referidas combinações imunoterapêuticas em animais induz um incremento tanto na resposta de

anticorpos quanto na resposta imune celular dos animais tratados.

[00027] São comparados a captura de tumores, o volume tumoral e a sobrevida dos animais tratados em comparação com grupos de animais de controle, os quais foram tratados com cada uma das vacinas em separado ou com preparações de controle.

[00028] Depois do tratamento com as referidas combinações imunoterapêuticas nos animais se observam uma menor incidência tumoral, uma diminuição do crescimento tumoral e um aumento na sobrevida, não só em comparação com o grupo tratado apenas com os adjuvantes, mas também com respeito aos grupos tratados com as diferentes vacinas em separado.

4. Combinações imunoterapêuticas que provocam uma potencialização da resposta imunológica e do efeito anti-tumoral entre vacinas que contêm um dos gangliosídeos e vacinas idiotípicas, ou entre as últimas, em pacientes:

[00029] Os procedimentos antes referidos podem ser aplicados a pacientes em diferentes estados clínicos com tumores que superexpressam os gangliosídeos. Dentre estes tipos se encontram tumores do sistema digestivo, do sistema urogenital, do pulmão, de mama, melanomas, sarcomas ou de origem neuroectodérmica.

[00030] O procedimento consiste em uma fase de indução na qual os pacientes recebem entre 3 e 10 doses em uma faixa entre 0,1 e 5 mg de AcM murino que reconhece o gangliosídeo, com um tempo entre cada dose que oscila de 7 a 14 dias. Estes pacientes receberão durante esta fase entre 3 e 10 doses em uma faixa de 60 a 1.000 μg de cada vacina que contém o gangliosídeo, com um tempo entre cada dose que oscilará de 7 a 14 dias.

[00031] Uma segunda combinação imunoterapêutica é aquela na qual os pacientes são imunizados com 3 a 10 doses em uma faixa entre 0,1 e 5 mg de um AcM anti-idiotipo específico contra um anticorpo anti-

gangliosídeo, com um tempo entre cada dose que oscila entre 7 e 14 dias. Estes pacientes receberão durante esta fase entre 4 e 6 doses em uma faixa de 60 a 1.000 μg de vacina que contém o gangliosídeo, com um tempo entre cada dose que oscilará entre 7 e 14 dias.

[00032] Uma terceira combinação terapêutica é aquela na qual os pacientes são imunizados com AcM murino que reconhece o gangliosídeo, com as mesmas doses, freqüência e intervalos antes mencionados, e que durante este período os pacientes recebem entre 3 e 10 doses em uma faixa entre 0,1 e 2 mg de um AcM anti-idiotipo específico contra um AcM anti-gangliosídeo. As vacinas podem ser formuladas com produtos independentes ou dentro de uma mesma formulação de vacina no caso de serem administradas simultaneamente.

[00033] As vacinas são administradas em um adjuvante que pode ser alumina (1 - 5 mg/dose), Montanide ISA (0,6 - 1,2 mL/dose), um outro apropriado. O volume total de uma dose oscila entre 10 μL e 2 mL.

[00034] A vacina que contém o ou os gangliosídeos pode ser administrada por via intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intramucosal ou combinações destas. As vacinas que contêm os anticorpos podem ser administradas por estas mesmas vias.

[00035] Neste período de vacinação são realizadas extrações de sangue para a medição de parâmetros de bioquímica sanguínea e de títulos de anticorpos específicos. Também são obtidos linfócitos dos pacientes para estudos da imunidade celular. As citadas extrações são realizadas com uma freqüência que pode ser desde uma semana a três meses. Posteriormente, é realizada uma fase de manutenção na qual os pacientes podem receber reimunizações de cada uma das vacinas nas concentrações antes mencionadas, em intervalos entre 1 e 6 meses, de forma simultânea ou em diferentes momentos, por um período de 1 a 2 anos.

[00036] A administração das referidas combinações

imunoterapêuticas nos pacientes induz um incremento tanto na resposta de anticorpos quanto na resposta imune celular, e tem impacto sobre o crescimento do tumor.

Exemplos de realização:

Exemplo 1: Indução da ativação de células T anti-idiotipo (T2) e anti-anti-idiotipo (T3), no modelo singênico mediante a imunização com o AcM murino P3.

[00037] Ratas Balb/c e atímicas do mesmo fundo genético, de 6-8 semanas de idade, foram imunizadas com 100 μg de AcM murino P3 (anti-gangliosídeos N-glicolilados) (Número de Depósito ECACC 94113026; Vázquez e col., Hybridoma 14; 1995:551-558; Moreno e col. Glycobiology 8; 1998:695-705) emulsificado em adjuvante completo de Freund (ACF) por via subcutânea, seguido de uma reimunização com 50 μg deste AcM emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (AIF) sete dias depois. No dia 10, os gânglios linfáticos de foram coletados e se obtiveram os linfócitos pressionando-se os gânglios com o êmbolo de uma seringa. A suspensão celular obtida foi utilizada em experimentos de proliferação celular, a qual foi medida pela incorporação de timidina tritiada. Se mediu a capacidade dos linfócitos obtidos de proliferarem *in vitro* ao se adicionarem nos cultivos concentrações entre 25 e 150 μg/mL tanto de AcM murino P3 quanto de seu AcM anti-idiotipo 1E10 (Número de Depósito ECACC 97112901). Foram tomados como controles AcMs murinos de mesmo isotipo que dos AcMs antes mencionados. Foram considerados índices de proliferação positivos aqueles iguais ou maiores do que 3. Foi demonstrado que os linfócitos obtidos logo após a imunização das ratas Balb/c com o AcM P3 proliferaram especificamente na presença de AcM P3, e não foi observada proliferação ao entrarem em contacto com o AcM murino A3 (IgM) (Alfonso M. e col. Hybridoma 14; 1995:209-216). Esta proliferação foi dependente da presença de células T, quando não propriamente obtidas de células provenientes de ratos

atímicos. A imunização com o AcM murino P3 induziu não apenas a proliferação de células T contra o idiotipo de AcM P3 (T2), mas também ativou a proliferação de células T anti-anti-idiotipo (T3), pois os linfócitos foram capazes de proliferarem in vitro também contra o AcM murino anti-idiotipo 1E10 (IgG1), e não contra o AcM C5 de mesmo idiotipo (IgG1) (Figura 1).

Exemplo 2: Indução da ativação de células T anti-idiotipo (T2) e anti-anti-idiotipo (T3) em ratos mediante a imunização com o anticorpo P3 quimérico.

[00038] O anticorpo P3 quimérico, cujas seqüências de aminoácido de suas regiões variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL) se mostram nas Figuras 8 e 9 respectivamente, foi utilizado para imunizar ratas Balb/c, de 6-8 semanas de idade. Na primeira imunização foram utilizados 100 μg de anticorpo emulsificado em ACF por via subcutânea, seguido de uma reimunização com 50 μg de anticorpo emulsificado em AIF sete dias depois. No dia 10 os gânglios linfáticos foram coletados e foi medida a capacidade linfoproliferativa destas células ao se adicionarem nos cultivos: o anticorpo P3 quimérico, o anticorpo 1E10 quimérico, cujas seqüências das regiões variáveis são mostradas nas Figuras 13 e 14, o AcM P3 murino e o AcM murino 1E10. Como controles foram utilizados o AcM murino C5 (reivindicação da Patente WO 97/33916 A1) e sua variante recombinante. Os linfócitos das ratas imunizadas com o anticorpo P3 quimérico proliferaram especificamente quando foram cultivados na presença deste anticorpo quimérico, do mesmo modo que na presença de AcM 1E10 quimérico e de suas variantes murinas, e diferentemente contra os anticorpos utilizados como controles de isotipo. Foi demonstrado que o anticorpo P3 quimérico mantém a capacidade de indução de uma proliferação específica de células T anti-idiotipo (T2) e anti-anti-idiotípica (T3) (Figura 2).

Exemplo 3: Potencialização do efeito anti-tumoral produzido por

uma vacina GM3-VSSP/Montanide ISA 51 pela combinação com uma vacina composta por AcM murino 1E10 adsorvido em gel de alumina.

[00039] Um grupo de ratas C57BL/6 de 6-8 semanas de idade foi imunizado por via subcutânea com 50 μg de AcM murino 1E10 adsorvido em gel de alumina nos dias 0, 14, 28 e 42. As ratas foram imunizadas por via intramuscular com 120 μg de GM3-VSSP/Montanide ISA 51 nos dias 7, 21, 35 e 49. Outro grupo de ratas foi imunizado de forma semelhante, mas iniciando as imunizações com a preparação de vacina que contém o gangliosídeo GM3. Grupos de controles imunizados nos mesmos intervalos de tempo e no mesmo número de doses de cada uma das vacinas em separado ou imunizados apenas com solução salina tamponada com fosfato foram utilizados nestes experimentos. Em todos os grupos foram inoculadas 10.000 células de tumor murino B16 por via subcutânea no dia 63. Todos os grupos foi medido o tamanho do tumor.

[00040] Para análise estatística das medições do tamanho do tumor foram comparados todos os grupos com respeito ao grupo de controle que apenas recebeu PBS mediante o Modelo Linear Misto. A vacinação com o AcM 1E10 não protegeu contra uma infecção de 10.000 células de melanoma B16. A vacina VSSP-GM3 provocou uma retardação do crescimento tumoral ($p<0,05$). As combinações de vacinas GM3-VSSP e de AcM 1E10 tiveram um efeito ainda maior que a vacina GM3-VSSP sobre o retardo tumoral ($p<0,05$) (Figura 3).

Exemplo 4: Esquema de imunização em pacientes com câncer com a vacina NeuGc-GM3-VSSP utilizando Montanide ISA 51 como adjuvante.

[00041] Com o objetivo de demonstrar a segurança e a imunogenicidade da imunização com a vacina NeuGcGM/VSSP usando como adjuvante Montanide ISA 51 (Patentes US 5.788.985 e US 6.149.921), foi realizado um ensaio clínico no qual se imunizaram 20

pacientes com melanoma maligno avançado, os quais não eram elegíveis para nenhum outro tratamento onco-específico.

[00042] Os pacientes receberam 9 doses de preparado de vacina que continham 20 μg de gangliosídeo. Estas doses foram administradas nos dias 0, 14, 28, 42, 56, 84, 112, 140, 168. Os pacientes foram reimunizados cada 28 dias depois do sexto mês a critério dos clínicos até completarem 1 ano de tratamento.

[00043] Foram realizadas extrações de sangue para a determinação da bioquímica sanguínea e dos títulos de anticorpos contra o gangliosídeo NeuGcGM nos dias 0, 14, 28, 56, 112, 168, 224, 280, 332.

[00044] Os títulos de anticorpos foram medidos mediante um ensaio de ELISA considerando-se como positivos os valores de DO iguais ou maiores do que 0,1 referidos ao metanol.

[00045] A toxicidade da vacina NeuGcGM-VSSP/Montanide ISA 51 consistiu de eritema e dor local, endurecimento no local do sítio de injeção, febre. Toxicidade ligeira de grau I/II segundo o critério da OMS.

[00046] Os pacientes desenvolveram títulos de anticorpos específicos contra NeuGcGM entre 80 e 2560, detectando-se em 100% dos pacientes a presença de anticorpos de tipo IgM, 100% de IgG e 75% de IgA (Tabela I).

[00047] No paciente 01 que entrou no ensaio com diagnóstico de melanoma maligno avançado (Enfermidade Metastática Evolutiva, sigla EME), logo após dois meses de tratamento foi observada regressão e estabilização de algumas lesões cutâneas e a presença de despigmentação ao redor das lesões nas quais se demonstrou por estudos anatomopatológicos em biópsias da lesões, a presença de infiltrado inflamatório e de necrose (Figura 4).

[00048] No paciente 02 com diagnóstico de melanoma maligno avançado se observou a estabilização de uma lesão metastática pulmonar no vértice direito 18-20 mm, durante ao menos 4 meses (Figura 5).

Tabela I:

Título de anticorpos contra NeuGcGM em pacientes com melanoma maligno avançado imunizados com a vacina NeuGcGM/VSSP/Montanide ISA 51

Pacientes	Dia	IgM	IgG	IgA
01	0	0	0	0
	14	640	80	320
	28	320	160	320
	56	1280	160	320
02	0	160	160	160
	14	160	160	320
	28	160	160	320
	56	1280	320	320
03	0	80	320	0
	14	320	320	0
	28	640	320	0
	56	640	640	0
04	0	0	0	0
	14	160	80	160
	28	1280	80	160
	56	2560	640	2560

Exemplo 5: Esquema de imunização em pacientes com câncer com a vacina que contém o AcM anti-idiotipo 1E10 e utilizando gel de alumina como adjuvante.

[00049] Com o objetivo de demonstrar a segurança e imunogenicidade da imunização com a vacina que contém AcM anti-idiotipo 1E10 (Patentes US 5.817.513 e US 6.063.379) e utilizando o gel de alumina como adjuvante, foi realizado um ensaio clínico no qual foram imunizados 20 pacientes com melanoma maligno avançado, os quais não eram elegíveis para nenhum outro tratamento onco-específico.

[00050] Os pacientes receberam 4 doses de preparado de vacina que contêm 2 mg de AcM 1E10.

[00051] Foram realizadas extrações de sangue para a determinação da bioquímica sanguínea e dos títulos de anticorpos contra idiotipo do AcM 1E10 e contra o gangliosídeo NeuGcGM3 antes do começo do

tratamento e 14 dias após cada imunização.

[00052] Os títulos de anticorpos foram medidos mediante um ensaio de ELISA considerando-se como positivos os valores de DO iguais ou maiores do que 0,15.

[00053] A administração do preparado de vacina aos pacientes produziu uma toxicidade ligeira, classificada de grau I e II de acordo com os critérios da OMS.

[00054] Em 16 de 17 pacientes avaliáveis foi desenvolvida uma forte resposta de anticorpos Ab3 de tipo IgG, detectável logo após o recebimento de 2 ou 3 doses de preparado de vacina. A análise da especificidade desta resposta acarretou como resultado que os soros de todos os pacientes tiveram um reconhecimento maior de AcM 1E10 do que o restante dos AcMs de igual isotipo utilizados como controles, o que sugeriu a indução de uma resposta específica contra o idiotipo de AcM 1E10. Isto foi corroborado quando foi observado que os soros dos pacientes reconheciam fortemente um dos fragmentos $F(ab')_2$ do AcM 1E10 com um título médio de 1:15000 (Títulos de 1:10000 a maior do que 1:100000), com pouco ou nenhum reconhecimento dos fragmentos $F(ab')_2$ do restante dos AcMs de controle de igual isotipo (Figura 6).

[00055] Os anticorpos gerados contra o GM3(NeuGc) foram, em geral, tanto do tipo IgM quanto IgG, com o título médio de 1:4000 e 1:8000, respectivamente (Figura 7).

[00056] Em uma paciente que entrou no ensaio com diagnóstico de melanoma maligno com enfermidade metastática hepática, logo após o tratamento se observou uma estabilização da enfermidade por 8 meses e a sobrevida da paciente foi de 15 meses.

Exemplo 6: Esquema de imunização combinada de vacina que contém o AcM 1E10 e da vacina NeuGcGM-VSSP.

[00057] Uma paciente com diagnóstico de metástase de melanoma maligno metastático, a qual havia tido como tratamento prévio a uma

vacinação cirurgias com intervalos mensais desde seu diagnóstico, recebeu 6 doses da vacina 1E10 adsorvida em um gel de alumina (2 mg de AcM por dose) nos dias 0, 14, 28, 42, 56. Em adição recebeu de forma alternada nos dias 7, 21, 35, 49, 63 a vacina que continha 200 μg de NeuGcGM-VSSP (200 μg de gangliosídeo) e Montanide ISA 51 como adjuvante. Posteriormente foi reimunizada em duas ocasiões em intervalos mensuráveis com ambas as vacinas simultaneamente. Durante o período de vacinação não apareceram novas lesões e a paciente se manteve um bom estado geral.

Exemplo 7: Reconhecimento de tecidos tumorais pelo AcM 14F7.

[00058] Tem sido demonstrado que o AcM 14F7 reconhece NeuGcGM3 (patente WO9940119). No presente exemplo são mostrados resultados de reconhecimento deste AcM de diversas localizações tumorais humanas.

[00059] Os tecidos foram fixados em uma solução de formalina tamponada a 10% e foram desidratados, clarificados e inseridos em parafina. A histopatologia foi avaliada em cortes corados com hematoxilina eosina.

[00060] Cortes consecutivos confeccionados a partir dos blocos avaliados histologicamente foram usados para realizar a imunomarcação pelo método do complexo de biotina estreptavidina peroxidase descrito previamente (Hsu, S. M. e Raine, L. 1981, J. Histochem. Cytochem., 29:1349-1353).

[00061] Os cortes desparafinados e reidratados foram tratados com 3% de peróxido de hidrogênio (solução de metanol) durante 30 minutos, para eliminar a atividade de peroxidase endógena. Os cortes foram incubados com o AcM 14F7 (purificado) durante 1 hora na temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado soro anti-rato biotinilado e complexo de estreptavidina peroxidase (Dakopatts) na temperatura ambiente.

[00062] Entre as incubações, os cortes foram lavados com uma solução salina tamponada com Tris-HCl. A reação da peroxidase (POD) foi revelada ao se usarem 5 mL de uma solução tamponada de Tris-HCl, 0,005 mL de H_2O_2 a 30% e 3 mg de 3,3-diamino-benzidina.

[00063] As lâminas foram lavadas com água corrente contrastadas com hematoxilina de Mayer, foram recobertas com um meio de montagem que continha bálsamo e foram tampadas com lamínulas. A reação com a enzima produz uma coloração carmelita-marrom.

[00064] Os fragmentos de biópsias frescas de tecido patológico foram obtidos dentro de uma hora posteriormente à exérese cirúrgica. Todos os tecidos foram lavados com solução salina, foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e foram conservados congelados a -80ºC. Os fragmentos congelados foram cortados em criostato Leica a -25ºC obtendo-se cortes seriados a 5 μm que foram secos ao ar e foram utilizados imediatamente à conservação a -20ºC envolvidos em papel de alumínio e foram pós-fixados em paraformaldeído a 4% durante 20 minutos.

[00065] A Tabela II mostra o estudo imuno-histoquímico de AcM 14F7 em novas localizações de tecidos patológicos humanos onde se avalia um forte reconhecimento na membrana e no citoplasma de mais do que 50% das células tumorais. A coloração foi muito intensa em carcinomas de cólon, de útero, de ovário, sarcomas, metástases ganglionares e cerebrais, de mama, assim como metástase de melanoma maligno.

Tabela II:
Resultados da imunocoloração com o AcM 14F7 em diferentes localizações tumorais.

Localização tumoral	**Reconhecimento por imunocoloração (Positivas/Total)**
Carcinomas de cólon	9/9*
Carcinomas de útero	2/2*
Carcinomas de ovário	2/2*
Sarcomas de partes moles	2/2*
Tumores primários de mama e suas metástases ganglionares	6/6*
Metástase de melanoma	2/2*

* Marcação intensa em mais de 50% das células tumorais em citoplasma e membrana.

Breve descrição das figuras:

[00066] **Figura 1.** Ratos Balb/c eutímicos e atímicos foram imunizados por via subcutânea com 100 μg de AcM murino P3 emulsificado em ACF seguido por uma reimunização com 50 μg de AcM emulsificado em AIF. Três dias depois foram coletadas as células dos gânglios linfáticos e se realizou o experimento de proliferação na presença de diferentes concentrações de AcMs P3, A3, 1E10 e C5.

[00067] **Figura 2.** Ratos Balb/c foram imunizados por via subcutânea com 100 μg de anticorpo P3 quimérico em ACF seguido por uma reimunização com 50 μg de anticorpo emulsificado em AIF. Três dias depois foram coletadas as células dos gânglios linfáticos e se realizou o experimento de proliferação na presença de diferentes concentrações de diferentes anticorpos murinos e quiméricos.

[00068] **Figura 3.** Cinética do crescimento de tumor murino B16 em ratos imunizados com as combinações terapêuticas da vacina idiotípica que contêm o AcM anti-idiotipo 1E10 e da vacila GM3-VSSP, segundo se detalha no Exemplo 3.

[00069] **Figura 4.** Estudo comparativo das lesões metastáticas em pele em paciente com melanoma. As fotografias foram tomadas previamente à imunização com a vacina NeuGcGM/VSSP/ ISA 51, 2 e 4 meses depois do tratamento. Se observam halos despigmentados ao redor de algumas das lesões, lesões estabilizadas, lesões que diminuíram e uma lesão que aumentou de tamanho.

[00070] **Figura 5.** Estudo comparativo por Tomografia Axial Computadorizada das lesões metastáticas no vértice direito pulmonar, com um tamanho de 18x20 mm em paciente com melanoma maligno, previamente à imunização com a vacina NeuGcGM/VSSP/ ISA 51 e 4 meses depois da imunização. Se observa estabilização da lesão.

[00071] **Figura 6.** Reconhecimento dos fragmentos F(ab')2 de AcM 1E10 e de outros AcMs de igual isotipo pelos soros dos pacientes imunizados com a vacina idiotípica que contêm o AcM1E10 e gel de alumina como adjuvante.

[00072] **Figura 7.** Reconhecimento dos gangliosídeos GM3(NeuGc) (N-glicolilado) e GM3 (N-acetilado) pelos soros dos pacientes imunizados com a vacina idiotípica que contêm o AcM 1E10 e o gel de alumina como adjuvante.

REIVINDICAÇÕES

1. Combinação imunoterapêutica para a imunoterapia de tumores que superexpressam gangliosídeos, caracterizada pelo fato de que contém anticorpo anti-idiotipo murino 1E10 (Número de Depósito ECACC 97112901) em uma variação de 25µ a 1mg adsorvido em hidróxido de alumínio variando de 62,5µ a 2,5mg e a vacina GM3-VSSP variando de 25µ a 1mg e Montanide ISA 51 como adjuvante variando de 0,1 a 1,2mL/dose.

2. Uso de uma combinação imunoterapêutica como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para o tratamento de tumores que superexpressam gangliosídeos.

3. Uso de uma combinação como definida na reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para o tratamento de câncer de mama, de pulmão, do sistema digestivo, do sistema urogenital, melanomas, sarcomas e tumores de origem neuroectodérmica.

4. Uso de um método para controle do crescimento e/ou da proliferação de tumores que superexpressam gangliosídeos, caracterizado pelo fato de compreender uma combinação imunoterapêutica como definida na reivindicação 1 para o preparo de um medicamento para administração em mamíferos.

5. Uso de um método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que os mamíferos são humanos.

PT 2006675

Figura 1

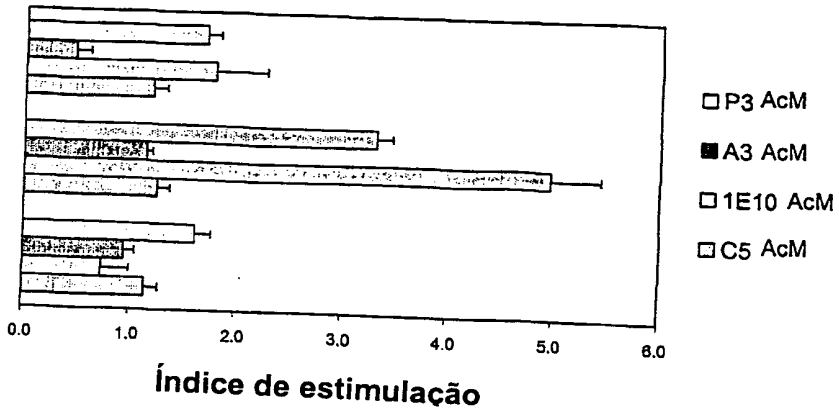


Figura 2

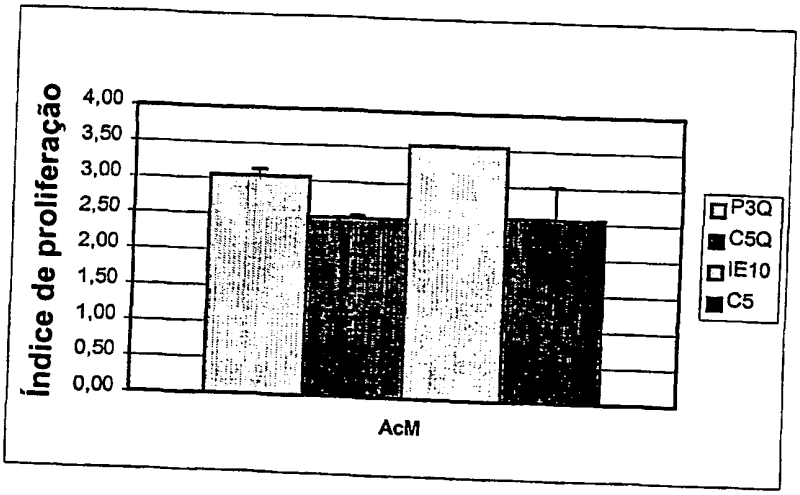


Figura 3

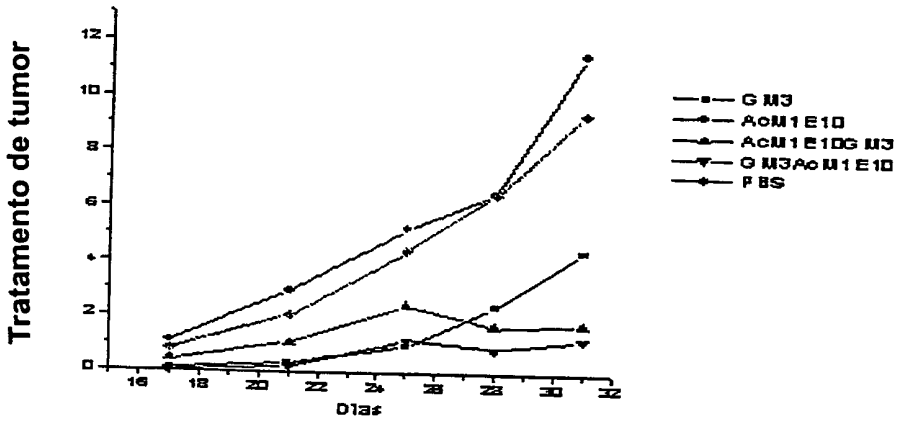


Figura 4

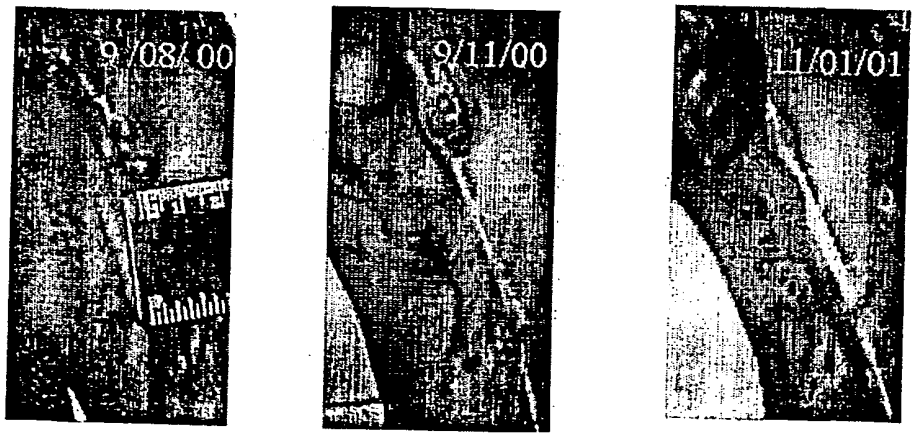


Figura 5

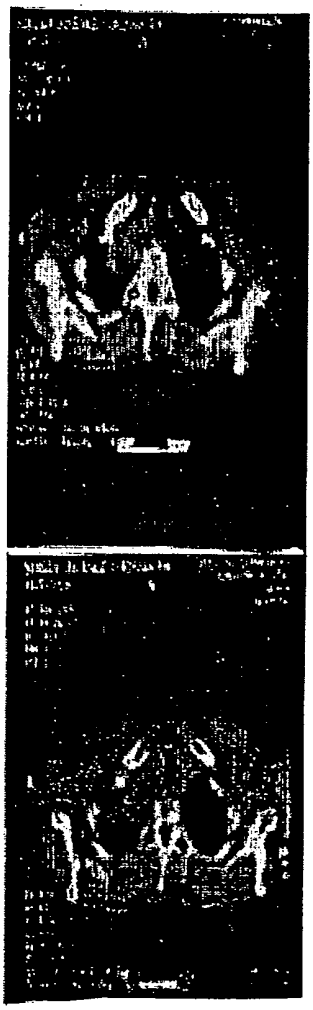


Figura 6

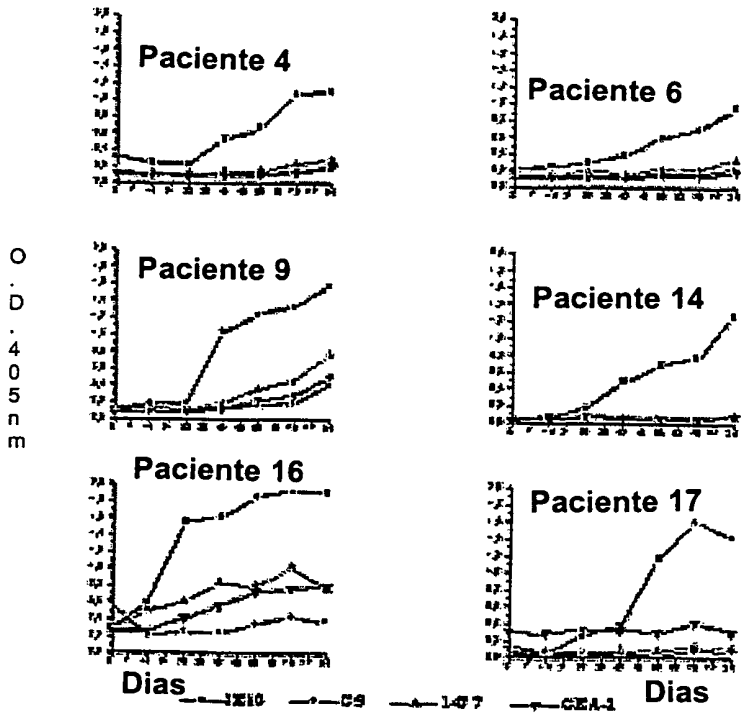
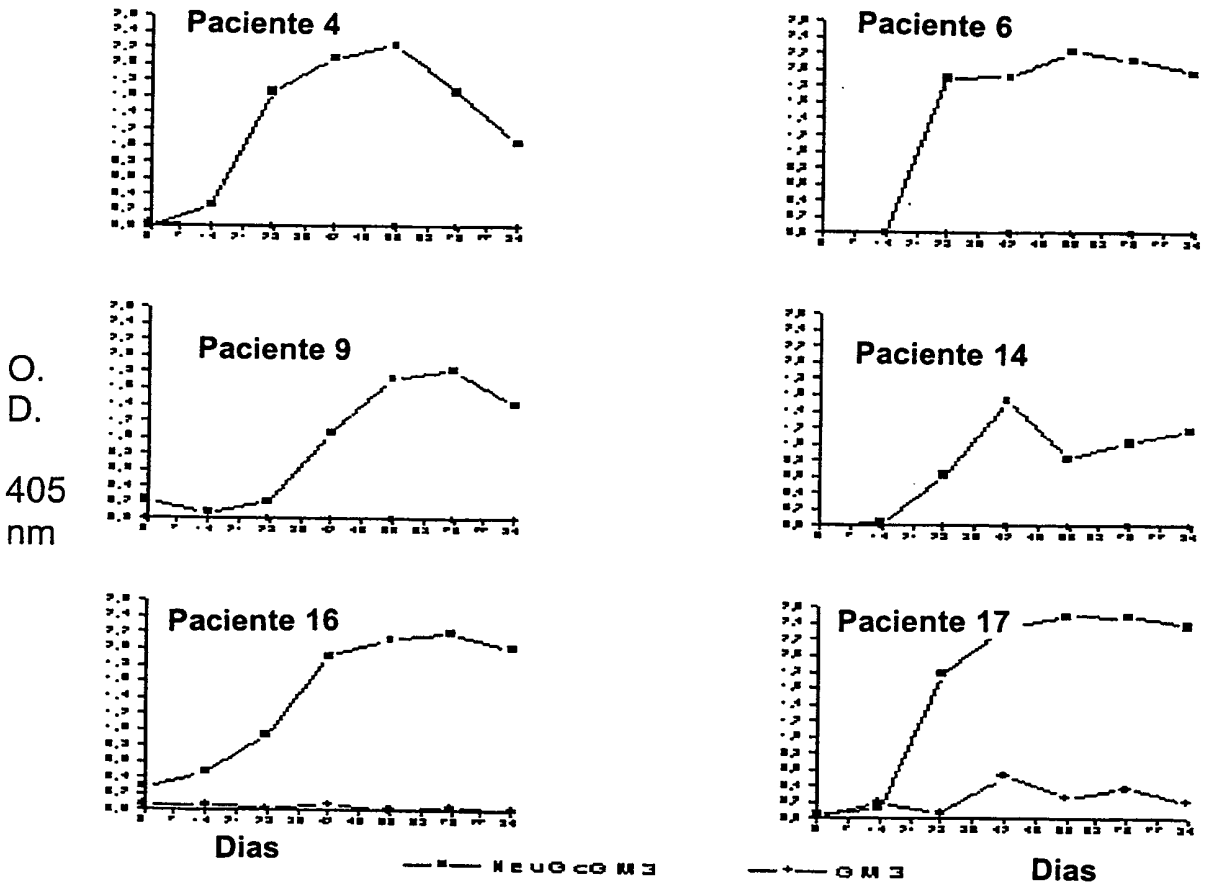

Paciente 4
Paciente 6
Paciente 9
Paciente 14
Paciente 16
Paciente 17
O.D. 405nm
Dias
Dias

Figura 7


Paciente 4
Paciente 6
Paciente 9
Paciente 14
Paciente 16
Paciente 17
O.
D.
405
nm
Dias
Dias