



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 883**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99924258 .9**  
86 Fecha de presentación : **14.05.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1077721**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

54 Título: **Prevención y tratamiento de la hipergastrinemia.**

30 Prioridad: **15.05.1998 US 85714 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

73 Titular/es: **Receptor Biologix, Inc.**  
**3350 W. Bayshore Road, Suite 150**  
**Palo Alto, California 94303, US**

72 Inventor/es: **Gevas, Philip, C.;**  
**Grimes, Stephen;**  
**Karr, Stephen;**  
**Michaeli, Dov y**  
**Watson, Susan**

74 Agente: **Pablos Riba, Julio de**

ES 2 286 883 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

Prevención y tratamiento de la hipergastrinemia.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la prevención y/o tratamiento de hipergastrinemia mediante control inmunológico de los niveles de gastrina.

10 **Antecedentes de la invención**

En los humanos, el tratamiento con inhibidores de bomba de protones, infección con *Helicobacter pylori* y anemia perniciosa, se ha tenido en cuenta en la mayoría de los casos de hipergastrinemia. Una marcada hipergastrinemia se puede ver en el relativamente poco frecuencia Síndrome de Zollinger-Ellison (ZES). Uno de los efectos directos de la hipergastrinemia es, por supuesto, las altas velocidades de secreción de ácido gástrico en el estómago.

Alrededor del 90% de los pacientes con anemia perniciosa (PA) son hipergastrinémicos, y los niveles totales de gastrina pueden elevarse hasta cuarenta veces por encima de los niveles normales. Un estudio reciente de Varro *et al.*, *J Clin. Invest.* 95; 1642-1649 (1995) ha demostrado que la hipergastrinemia asociada a la PA está compuesta por una gastrina amidada sustancialmente elevada, y por elevaciones moderadas en los precursores de progastrina y en la glicina extendida G17 (Gly-G17).

Los péptidos de gastrina son los productos de procesamiento extensivo post-traslacional como se ha marcado en la Figura 1. El primer producto de traslación de un mRNA simple de 0,7 kb es la pre-progastrina precursora del aminoácido 101. Este péptido s translocado en el lumen del retículo endoplásmico rugoso en el que se convierte en el péptido progastrina. La progastrina se mueve a través del canal secretor hasta el apilamiento de golgi, y se sulfata en Tyr<sup>87</sup> con anterioridad al desdoblamiento endoproteolítico y la maduración en los gránulos secretores. Como consecuencia, la progastrina se procesa para dar G34 a partir del desdoblamiento dibásico en las posiciones Arg<sup>57</sup> Arg<sup>58</sup> y Arg<sup>94</sup> Arg<sup>95</sup> y para dar G17 a partir de desdoblamiento dibásico en los sitios Lys<sup>74</sup> Lys<sup>75</sup> y Arg<sup>94</sup> Arg<sup>95</sup>. Mientras que la pre-hormona convertasa 2 (PC2) que produce G17 se sitúa principalmente en la cavidad gástrica, las prohormonas convertasa PC I/PC3 que producen G34 se sitúan en el duodeno. Los residuos de desdoblamiento dibásico se extraen mediante carboxipeptidasa H(CPH) que produce gastrina extendida Gly<sup>93</sup> que sirve como sustrato para la enzima de amidación, PAM (monooxigenasa de  $\alpha$ -amidación de peptidilglicina).

La gastrina G17 amidada parece ser un producto de conversión de G34 NH<sub>4</sub> que es un producto de amidación de Gly G34. Se ha pensado en el Gly G17 como un segundo punto final de procesamiento de progastrina.

Los efectos de la gastrina sobre células tumorales se producen a través de los canales endocrino, paracrino, autocrino e intracrino (Figura 2) donde, sin embargo, no han sido caracterizados todos los tipos de receptores. Se sabe que la gastrina exógena estimula las células tumorales gástricas y colo-rectales y las líneas de células tumorales.

La mayor parte de los pacientes de PA, tienen hiperplasia endocrina en el corpus y fundus gástricos. Existe una importante correlación positiva entre el grado de hipergastrinemia y el número de células de tipo enterocromafina (ECL). Sin embargo, el tipo histológico de hiperplasia de célula ECL no depende del grado de hipergastrinemia puesto que no hay diferencia significativa en los niveles de gastrina en pacientes con hiperplasia lineal o nodular. Una vez que se ha diagnosticado, a pesar de los niveles de gastrina continuamente elevados, la hiperplasia celular ECL parece mantenerse estable.

La proporción de prevalencia de carcinoma gástrico en pacientes de PA examinados endoscópicamente, varía entre 4 y el 7%. Los pacientes con carcinoma son diagnosticados como que padecen PA 10 años antes que la media de pacientes de PA. Esto precede a la diagnosis del tumor carcinoma en una media de 10 a 12 años. No hay signo predictivo para la ocurrencia de carcinoma gástrico en pacientes con PA, aunque los niveles medio de gastrina serosa son más altos en el carcinoma en comparación con la hiperplasia ECL [Brinton *et al.*, *Brit J. Cancer*, 59; 810-813 (1989)]. El estímulo para someter la transformación maligna, se cree que es proporcionado por los anticuerpos que están presentes. Los tumores parecen hormonalmente dependientes. Los pacientes que se han sometido a antrectomía a efectos de corregir la hipergastrinemia, han demostrado la desaparición de pólipos hiperplásticos, carcinoides o micronódulos agirófilos diagnosticados endoscópicamente y/o histológicamente. La demostración de la resolución completa de carcinoides de células ECL tras una antrectomía en algunos pacientes, confirma la potencia de la hipergastrinemia como principio trófico para células ECL fúndicas.

En la PA, la evidencia de algún efecto de la hipergastrinemia asociada sobre otros cánceres en el tracto gastrointestinal, se revela solamente a partir de estudios epidemiológicos. Diversos estudios han buscado la existencia de cáncer colo-retan en PA. Se ha descrito un ligero incremento en la prevalencia de cáncer colo-rectal en los primeros años tras la diagnosis de PA [Tralley *et al.*, *Annis Int. Medicine*, 111; 738-742 (1989)].

Los estudios han demostrado también una prevalencia incrementada (aproximadamente un 7%) de adenocarcinoma gástrico en PA. La hipergastrinemia puede ser responsable de este incremento observado. A pesar de que no se puede

encontrar una correlación con los niveles de gastrina serosa en la mayoría de los paciente con cáncer gástrico, siempre está presente una correlación con la gastritis atrófica crónica.

5 Los estudios epidemiológicos han fallad en cuanto a mostrar un incremento consistente en la incidencia e cáncer  
colo-rectal en PA. Esto puede ser debido a un diseño deficiente de los estudios. En cada análisis, los pacientes de  
PA fueron comparados con controles no investigados de población en general. Se puede esperar que una parte de los  
6 controles sean hipergastrinémicos debido a infección de *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica, o a la administración  
posterior de un inhibidor de bomba de protones. El fallo aparente para mostrar un incremento en la incidencia de tumores  
pudo ser explicado por la acción de la gastrina: ésta actúa como mitógeno, no como mutógeno. Sin embargo, puesto  
10 que la gastrina fomenta la proliferación de la mucosa colónica normal, puede existir una posibilidad incrementada de  
mutación espontánea, lo que podría afectar a la incidencia del tumor.

Un estudio simple realizado recientemente, ha sido dirigido a la velocidad de proliferación de células de colon  
normal en pacientes con PA en comparación con controles normales [Tralley *et al.*, citado anteriormente]. Los pacien-  
15 tes del control eran normogastrinémicos, y no tenían anormalidades colónicas comprobadas mediante colonoscopia o  
enema de bario. Con la utilización de 5'-bromodesoxiuridina para proporcionar un índice de proliferación, el porcen-  
taje de proliferación de células en la totalidad de las criptas fue similar en ambos grupos. En el grupo de PA existió  
una frecuencia de etiquetamiento significativamente más alta en las dos quintas partes de las glándulas ( $p < 0,01$ ). El  
movimiento del compartimento proliferativo se observa en individuos con alto riesgo de cáncer.

Se sabe que el tratamiento a largo plazo con omeprazol induce hiperplasia celular ECL que está relacionada con  
el nivel de gastrina del recto. Los tumores carcinoides relacionados con hipergastrinemia crónica en el estómago, han  
sido descritos en algunos sujetos de ensayo animales, por ejemplo en ratas, aunque no han sido confirmados aún en el  
ser humano [Sobhani *et al.*, *Gastroenterology*, 105; 22-30 (1993)].

Los inhibidores de bomba de protones causan un incremento del doble hasta el cuádruplo en la rapidez y en las  
concentraciones de gastrina de plasma postprandial. El incremento en la aceleración de hipergastrinemia se produce  
en unos pocos meses desde el inicio de la terapia. Ocasionalmente, se pueden desarrollar niveles de gastrina marca-  
25 damente elevados (10 veces) durante el tratamiento a largo plazo con omeprazol, por ejemplo con 20-60 mg/día. Los  
niveles de gastrina se estabilizan después de unos pocos meses de terapia, incluso aunque la dosis de omeprazol se  
30 reduzca desde 40 mg hasta 20 mg diarios [Sontag *et al.*, *Gastroenterology*, 102; 109-118 (1992)].

El crecimiento de células endocrinas gástricas ha sido monitorizado extensamente en pacientes tratados con 20 a  
40 mg de omeprazol diariamente hasta durante ocho años. No se han encontrado cambios significativos de las células  
35 antrales G y D incluso después de años de tratamiento con altas dosis de omeprazol [Tielemans *et al.*, *Gastroentero-  
logy*, 96; 723-729 (1989)]. Solamente pacientes con niveles de gastrina serosa más altos ( $>240$  pg/ml, cuatro veces  
el límite normal), mostraron un incremento en la densidad de volumen de volumen de células ECL gástricas entre  
el tercer y el quinto año de la terapia. Este dato sustenta hallazgos anteriores en el sentido de un incremento de la  
40 densidad en el volumen de células ECL está correlacionado con niveles elevados de formación rápida de gastrina se-  
rosa. Adicionalmente, la hiperplasia lineal y nodular estuvo confinada al grupo de pacientes con niveles más altos de  
gastrina serosa. No se observó displasia en ningún paciente.

Ha sido establecida una correlación entre diferentes grados de atrofia de la mucosa oxíntica. En pacientes que recibe  
40 mg de omeprazol diariamente durante ocho años, se ha encontrado que la prevalencia de hiperplasia micronodular  
45 en gastritis corpus superficial era baja, por ejemplo del 3,6%, incrementándose al 19,6% en gastritis intersticial y al  
48% en gastritis atrófica. Esta relación entre la gastritis atrófica y la hiperplasia micronodular puede ser explicada  
parcialmente por condensación de las células endocrinas causada por atrofia de las glándulas gástricas y por lo tanto  
no puede representar una verdadera hiperplasia. Por lo tanto, la hipergastrinemia con una duración excesivamente  
larga inducida por omeprazol, condujo solamente a hiperplasia lineal y simple. En pacientes con gastritis atrófica, o  
50 en aquellos con una predisposición genética, la hipergastrinemia da lugar a hiperplasia micronodular bajo tratamiento  
crónico.

La hiperplasia ECL en modelos animales se produce a continuación de la administración de omeprazol. El creci-  
miento relativo de células tanto exocrinas como endocrinas por hipergastrinemia, varía entre las especies. Por ejem-  
55 plo, la administración de omeprazol (400  $\mu$ mol/kg, 14 mg/kg) a ratones durante 10 semanas, dio como resultado un  
incremento del umbral en la gastrina del plasma durante el tratamiento. Además, el peso del estómago se había incre-  
mentado en un 34% y la densidad ECL en un 37% al final del tratamiento. Se ha encontrado que la misma dosis en las  
ratas incrementa los niveles de gastrina 10 veces, dando como resultado el mismo efecto trófico general (incremento  
del peso del estómago y de la mucosa) como en el ratón, pero la densidad celular ECL se incrementa en alrededor del  
60 300%. El significado de este desequilibrio en el efecto trófico de la gastrina sobre las células exocrinas y las células  
ECL durante el desarrollo de carcinoides en las ratas, es bien conocido.

Varios estudios han investigado el efecto de la hipergastrinemia sobre las células epiteliales colónicas normales.  
La mayor parte de estos estudios han inducido hipergastrinemia por omeprazol o como resultado de exclusión antral,  
65 y han producido resultados contradictorios. Se ha examinado el efecto de un tratamiento a largo plazo (1 año) de ratas  
hembra con altas dosis diarias de omeprazol (400  $\mu$ mol/kg, 14 mg/kg) que condujo a un incremento de 15 veces en la  
gastrina en comparación con los controles [Sundler *et al.*, en *Proc. The First International Symposium on Omeprazole*,  
K.O. Borg *et al.* eds. AB Hässle (1986)] El espesor de mucosa de la mucosa colónica y el número de células endocrinas

que contienen cromogranin-A, no se vieron afectados por la hipergastrinemia inducida por omeprazol. Sin embargo, los mismos animales desarrollaron una hiperplasia celular de gastrina antral modesta y estable. De forma similar, Oscarson (Surgery, 91(5); 525-530, Mayo 1982) demostraron que los cambios a largo plazo en la concentración de gastrina endógena producidos por fundectomía (que dan como resultado una elevación de gastrina de 3,5 veces), no dieron como resultado efectos tróficos mucosales colónicos.

Por el contrario, se demostró la proliferación significativamente incrementada de mucosa colónica en ratas tratadas con omeprazol en comparación con los controles [Paulikowski *et al.*, *Hormone & Metab. Res.*, 21; 89-91 (1989)]. La hipergastrinemia a corto plazo indujo proliferación de mucosa colónica así como también se demostró hipergastrinemia endógena crónica en ratas [McGrgor *et al.*, *Annals Surg.*, 195; 219-223 (1982)]. La hipergastrinemia crónica se consiguió mediante exclusión antral y la hipergastrinemia a corto plazo se consiguió por administración de pentagastrina (2 mg/kg) cada 12 horas durante 48 horas antes del sacrificio. El contenido de tejido y la síntesis de ADN, ARN y proteína, se incrementaron notablemente tanto como la gastrina endógena como con la pentagastrina exógena. La simulación mediante gastrina fue significativamente más fuerte que la de pentagastrina. Con la utilización de la técnica de detención de metafase, se ha demostrado también una actividad mitótica incrementada de las células de mucosa colónica en ratas tratadas con omeprazol en comparación con los controles [Lewinski *et al.*, *J. Pineal Res.*, 10 (2), (1991): 104-108].

La evidencia más precisa en cuanto al papel trófico de la gastrina, ha sido comprobado mediante el desarrollo de un ratón transgénico deficiente en gastrina. Estos ratones fueron incapaces de producir mRNA de gastrina y el péptido de gastrina [Koh *et al.*, *Gastroentology.* (1997), 113(3); 1015-1025]. Esta deficiencia ha permitido estudios sobre el efecto de la gastrina en el crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal.

Combinando técnicas de histología e inmuno-histoquímicas, junto con la incorporación de bromodesoxi-uridina, se averiguó el efecto de la gastrina exógena sobre la arquitectura colónica. Los ratones deficientes en gastrina tenían colonos normales. Se observó un índice reducido de etiquetamiento de proliferación ( $2,97\% \pm 0,52\%$ ) en tales ratones en comparación con los animales de tipo salvaje ( $4,71\% \pm 0,44\%$ ;  $P < 0,01$ ). La conclusión a partir de estas observaciones fue que la gastrina es trófica para la mucosa colónica normal [véase Koh *et al.*, citado anteriormente].

De acuerdo con Tang *et al.*; *Gastroenterology*, (1996), 111(5): 1212-1223, los tumores carcinoides del roedor *Mastomys* durante la progresión pierden respuesta a la hipergastrinemia exógena pero tienen una expresión regulada ascendente de transformación del factor de crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ). Puesto que la vía autocrina TGF- $\alpha$  actúa potencialmente de una manera cooperante con la vía autocrina de la gastrina [Howell *et al.*, *J. Call. Physiol.* (1995), 162(2): 256-265], la falta de respuesta de los carcinoides a la gastrina exógena puede reflejar la actividad creciente de la vía autocrina de la gastrina. El gen de gastrina se activa aparentemente en una menor medida en los adenomas que en los adenocarcinomas.

Los resultados en conflicto producidos por los estudios anteriores pueden ser explicados en parte por Wang *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 98; 1918-1929 (1996), en el que se proporcionó evidencia de que la progastrina, aunque se pensaba que era un precursor inerte, tiene también un efecto trófico sobre la mucosa colónica. El estudio incluyó el uso de ratones transgénicos que contenían un mini-gen de gastrina humana (hGAS), que expresa abundante mRNA de gastrina humana y de progastrina humana en el hígado. Los hepatocitos son incapaces de procesar este péptido hasta la forma amidada madura, dando como resultado niveles elevados de progastrina de suero y niveles normales de gastrina amidada. El resultado fue un marcado incremento en el índice de etiquetamiento de bromodesoxiuridina del colon, pero no de la mucosa gástrica, en ratones hGAS en comparación con los ratones de control de tipo salvaje, de una edad equivalente. Este estudio sugiere que la progastrina puede contribuir a la proliferación de mucosa colónica *in vivo*. Por lo tanto, en condiciones de hipergastrinemia, no sólo puede ser importante el grado de hipergastrinemia, sino que el péptido de gastrina particular que es elevado puede jugar un papel significativo. Las células epiteliales colónicas normales no expresan receptores clásicos de colecistoquinina B (CCK-B) de gastrina de modo que la acción de la gastrina debe ser ajustada mediante un receptor no caracterizado que ajuste la acción de los precursores de gastrina.

Según se ha expuesto en lo que antecede, la gastrina actúa como un mitógeno, y por lo tanto no se puede esperar que una célula mute. Esta hipótesis, ha sido confirmada en estudios de ratón hGAS transgénico. Sin embargo, si la mucosa tiene una relación de proliferación aumentada, puede existir una posibilidad incrementada de mutación esporádica. El único ejemplo de cambio maligno en modelos animales que se produce en presencia de hipergastrinemia, es el carcinóide en ratas a continuación de una administración de omeprazol a largo plazo. Aunque este hallazgo es particular para las ratas, y ningún otro animal produce carcinoides espontáneas, se entiende que el omeprazol puede tener un efecto carcinogénico directo. Sin embargo, el tipo de medicamentos inhibidores de bomba de protones que producen hipergastrinemia, hiperplasia ECL y carcinoides ECL en la rata, ha sido probado negativamente en cuanto a genotoxicidad. Los posteriores estudios han demostrado que no es un medicamento específico que conduzca a la formación de carcinóide; los carcinoides pueden ser producidos también por alimentación con 2000 mg/kg de ranitidina, loxitidina, el clofibrato de agente hipolipidémico y por el 75% de corpectomía, todos los cuales producen hipergastrinemia. El papel mediador de la gastrina fue confirmado cuando se demostró que la antrectomía en ratas impide la hiperplasia celular ECL inducida por omeprazol. La formación de carcinoides en ratas simplemente en presencia de hipergastrinemia, puede ser debida a su entorno genético.

No se tiene evidencia demostrada de que la hipergastrinemia produzca tumores espontáneos en otros lugares del tracto gastrointestinal. En los humanos, es evidente que se puede requerir un factor adicional para que para que las células ECL progresen desde una simple hiperplasia hasta un carcinoma. En PA, el factor adicional se proporciona posiblemente mediante la presencia de auto-anticuerpos.

5 Una vez que la célula ha sido transformada, la gastrina exógena puede seguir fomentando el crecimiento. Este efecto puede verse incrementado por la gastrina/receptores CCKB que son expresados *de novo* en los adenomas. El punto exacto de la secuencia de transformación de adenoma-carcinoma, en el que se expresan la gastrina/receptor CCKB y gastrina autocrina, no se conoce aún. La hipergastrinemia puede incrementar esta progresión de transformación a  
10 través de las fases de la secuencia adenoma-carcinoma.

Adicionalmente, se ha encontrado que el tratamiento con agentes dirigidos contra el exceso de producción de ácido gástrico, induce hiperplasia celular parietal e hipertrofia. Se ha informado sobre recientes casos que sugieren una correlación entre el tratamiento inhibitorio de ácido gástrico, ya sea mediante inhibidores de bomba de protones tal  
15 como omeprazol, lansoprazol, o ya sea con agentes de inhibición del receptor H<sub>2</sub> de la histamina, tales como ranitidina o cimetidina, y la ocurrencia de pólipos de glándulas fúndicas (FGP) [Van Vileborgh *et al.*, Acta Gastroenterol. Belg., (1997), 60(3): 240-242 y Choudhry *et al.*, Am. J. Clin. Pathol., (1998), 110(5): 615-621].

Un procedimiento terapéutico para neutralizar inmunológicamente, de forma selectiva, la actividad biológica de  
20 la hormona gastrina, podría proporcionar un medio efectivo para controlar o impedir los cambios fisiopatológicos resultantes de la hipergastrinemia.

Según se ha descrito en las Patentes U.S. co-asignadas núms. 5.609.870, 5.607.676, 5.622.702, 5.468.494 y 5.023.077, la inmunización contra las formas G17 y G34 de gastrina, puede realizar la neutralización de la gastrina de suero. Las construcciones inmunogénicas de esta invención incluyen un péptido (1-9)G17 amino terminal o un péptido (1-6)G34 amino terminal conjugado a través de un espaciador de péptido con un portador inmunogénico. La secuencia G17 preferida es la pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu [ID de SEC NÚM. 1], y la secuencia G34 preferida es la pGlu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis [ID de SEC NÚM. 2]. El espaciador preferido en ambas construcciones es un Ser-péptido (Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Cis [ID de SEC NÚM. 3]). El portador inmunogénico preferido es toxoide de difteria, toxoide de tétanos, keylimpet hemocianina, y albúmina de suero bovino (BSA). El inmunógeno de gastrina se define como un conjugado de la secuencia de péptido pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu [ID de SEC NÚM: 1], con un espaciador de aminoácido enlazado a un portador inmunogénico. El inmunógeno de gastrina preferido se define como un conjugado del péptido (1-9) amino terminal (pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu [ID de SEC NÚM: 1]), que está enlazado por medio del espaciador de péptido al toxoide de difteria. Se sabe además que la preparación de inmunógeno de gastrina es también eficaz para inhibir los precursores de gastrina de tipo progastrina o procesados de forma incompleta que puedan estar enlazados a la membrana celular de una célula de producción de gastrina.  
30  
35

Existe la necesidad en el estado de la técnica de composiciones y métodos para tratar de manera eficaz la hipergastrinemia.  
40

### Sumario de la invención

La presente invención está dirigida al tratamiento, para el control o prevención, de desórdenes gastrointestinales tales como hipergastrinemia, mediante administración de una preparación inmunógena de gastrina a un mamífero o humano que la padezca. En consecuencia, la invención es según se define en las reivindicaciones que siguen.  
45

Una realización preferida del tratamiento está dirigida al control o prevención de hipergastrinemia debida a anemia perniciosa.  
50

Otra realización preferida de esta invención va dirigida al tratamiento para el control o la prevención de efectos colaterales gastrointestinales debidos a agentes anti-úlceras tales como inhibidores de bomba de protones o agentes de bloqueo del receptor H<sub>2</sub> o antagonistas.

Otra realización preferida de esta invención consiste en tratar la hipergastrinemia relacionada con desórdenes o enfermedades colo-rectales mediante inmunización con inmunógeno de gastrina contra el péptido de gastrina G17, G34, gastrina amidada, y progastrina. En este contexto, el inmunógeno anti-G17 según se describe en las Patentes U.S. núms. 5.609.870; 5.468.494; 5.785.970 y en la solicitud de Patente co-asignada 08/798.423, se ha encontrado que proporciona un agente efectivo para estimular anticuerpos anti-G17 que reaccionan de forma cruzada con Gly extendida G17 (G17 - Gly), con G17 amidada (G17 NH<sub>2</sub>) de modo que sea adecuado para el tratamiento de tumores gastrointestinales que son una respuesta a estos péptidos de gastrina.  
55  
60

Una ventaja especial de la invención consiste en proporcionar un inmunógeno o anticuerpo específico para objetivar la proteína específica que da como resultado la hipergastrinemia. Por ejemplo, el Gly G17 y el G17 NH<sub>2</sub> pueden ser neutralizados con una composición inmunógena anti-G17, tal como G17 (1-9) Ser DT, mientras que la G34 puede ser neutralizada con inmunógenos anti-G34 (1-17).  
65

Además, G17 y G34 pueden ser neutralizados mediante inmunógenos anti-G34 (13-22) y anti-G34 (17-31) que generan anticuerpos capaces de reacción cruzada con ambos epítopes de gastrina. La inmunización pasiva se puede efectuar mediante los anticuerpos específicos generados mediante inmunógenos contra los diversos epítopes G17 y G34. Estos anticuerpos, reaccionan específicamente o por separado con los epítopes G17 o G34, o bien reaccionan con ambos epítopes de gastrina mencionados conjuntamente.

Una realización especialmente preferida de esta invención consiste en tratar o pre-tratar con inmunización de tipo inmunógeno de gastrina a un paciente o mamífero que esté bajo tratamiento crónico o de largo plazo con el inhibidor de bomba de protones, omeprazol o lansoprazol. Otra realización proporciona inmunización pasiva con anticuerpos anti-G17 que pueden ser humanizados para tratar la hipergastrinemia. Un tratamiento de combinación perfeccionado de hipergastrinemia y de producto en exceso concomitante de ácido gástrico incluye la administración de inhibidores de protones o de bloqueadores del receptor de histamina H<sub>2</sub>.

### Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 ilustra el procesamiento del precursor de gastrina hasta las formas de gastrina madura;
- La Figura 2 ilustra los diversos canales de actividad de la gastrina;
- La Figura 3 ilustra los aspectos estructurales de un inmunógeno de gastrina;
- La Figura 4 ilustra gastrina (intermedia) enlazada en sujetos normal e hipergastrinémico (el grupo de control inmunógeno no tenía gastrina serosa enlazada por encima del límite de detección de 10 pg/ml);
- La Figura 5 ilustra el porcentaje superviviente de ratones con hipergastrinemia experimental tratados con inmunógeno de gastrina en comparación con los controles;
- La Figura 6 representa el índice de proliferación media de tumores asociados de gastrina en ratones Min bajo tratamiento con inmunógeno de gastrina;
- La Figura 7 ilustra los niveles de anticuerpo en ratones Min inmunizados con G17 (1-9):DT;
- La Figura 8 compara los niveles de anti-G17 (1-9):anticuerpo DT del ratón Min en respuesta al inmunógeno hG17-DT + vehículo, inmunógeno hG17-DT + omeprazol, vehículo solamente, omeprazol solamente, controles positivo y negativo;
- La Figura 9 compara los niveles de suero G17 de ratón Min cuando se inmuniza con 1) inmunógeno hG17-DT más vehículo (G17 libre), 2) más vehículo (G17 enlazado), 3) más omeprazol (G17 libre), y 4) más omeprazol (G17 enlazado);
- La Figura 10 ilustra el porcentaje de animales supervivientes tras el tratamiento con vehículo oral más inmunógeno en bruto (n = 22); omeprazol (m = 18) más inmunógeno en blanco (n = 30), vehículo oral más inmunógeno de gastrina (n = 18), e inmunógeno de omeprazol hG17-DT (n = 30);
- La Figura 11 muestra el desplazamiento de G17 etiquetado desde la anti-N-gastrina terminal (del antisuero G7 de ratón anti-humano) mediante G17, Gly-G17 y G34 según se describe en el Ejemplo 5, y
- La Figura 12 muestra el desplazamiento de G17 etiquetado desde anti-C-gastrina terminal (del antisuero G7 de conejo anti-humano) mediante G17, Gly-G17 y G34 según se describe en el Ejemplo 5.

### Descripción detallada de la invención

Según se ha descrito en lo que antecede, las construcciones inmunogénicas útiles en esta invención incluyen un péptido aminoterminal (1-9)G17 o un péptido aminoterminal (1-6)G34 conjugado por medio de un espaciador de péptido con un portador inmunogénico. La secuencia G17 preferida es la pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu [ID de SEC NÚM: 1], y la secuencia G34 preferida es la pGlu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis [ID de SEC. NÚM. 2]. El espaciador preferido en ambas construcciones es un Ser-péptido (Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Cis [ID de SEC NÚM. 3]). El portador inmunogénico preferido es toxoide de difteria, toxoide de tétanos, hemocianina keylimpet, y albúmina de suero bovino (BSA). El inmunógeno de gastrina se define como un conjugado de la secuencia de péptido pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu [ID de SEC NÚM: 1], con un espaciador de aminoácido enlazado a un portador inmunogénico. El inmunógeno de gastrina preferido se define como un conjugado del péptido (1-9) amino terminal (pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu [ID de SEC NÚM: 1]), que está enlazado por el espaciador de péptido al toxoide de difteria.

Adicionalmente a los inmunógenos de anti-gastrina mencionados anteriormente, uno de los anticuerpos generados que se enlazan tanto al G17 como al G34, comprende un conjugado de los 7 aminoácidos de la secuencia 11-17-DT de aminoácido de C-terminal G17. Esta secuencia es E-A-Y-G-W-M-D-NH<sub>2</sub> [ID de SEC NÚM: 4]. Se observó

una inhibición de producción de ácido gástrico inducido de G34 y de G17 en estómagos de ratas profundidas tras una inyección intravenosa de 1 ml de antisuero de conejo Anti-C terminal G17 (11-17)-DT.

5 Con el fin de explorar si la gastrina puede fomentar progresión a malignidad en condiciones de pre-malignidad existentes, se emprendieron estudios, por ejemplo, en la neoplasia intestinal múltiple o el modelo de ratón conocido como Min de poliposis adenomatosa familiar (FAP). Los ratones tienen una mutación de línea germen en su gen APC que conduce a neoplasia intestinal múltiple. Se ha encontrado ahora que la hipergastrinemia que se indujo con el uso del inhibidor de bomba de protones, omeprazol, incrementa la progresión de malignidad en los ratones Min, reduciendo su supervivencia media desde aproximadamente 10 semanas a 6 semanas. El examen de proliferación de tumores de los ratones Min expuestos a niveles de gastrina elevados, puso de manifiesto, mediante la incorporación de bromodesoxiuridina, que la proliferación se incrementó.

15 Adicionalmente a los efectos proliferativos de la gastrina asociada al suero, que actúa de manera endocrina para incrementar la proliferación, la expresión del gen de gastrina ha sido demostrada también en la mucosa colónica en condición de pre-malignidad. En el ratón APC1628 transgénico, el gen de gastrina fue activado tanto en la mucosa colónica normal como en el epitelio maligno, [Smith *et al.*, *Brit J. Surg.*, 84: 706 (1997)]. Esto ha sido confirmado recientemente con la aplicación tanto de inmunocitoquímica como a nivel de gen en el ratón Min. Además, la activación del gen de gastrina ha sido encontrada en adenomas humanos [Smith *et al.*, (1997) citado anteriormente]. Así, una vía autocrina/paracrina ajustada en gastrina, puede ser también operativa en el escenario pre-maligno.

20 Se ha observado el efecto de la neutralización de la gastrina sobre la progresión de la secuencia de adenoma: carcinoma en el modelo de ratón Min de la poliposis adenomatosa familiar. Específicamente, ambas gastrina y gastrina asociada al suero presentes con el epitelio colónico, pueden contribuir hacia la progresión en cascada en el modelo de ratón Min, de la FAP. En consecuencia, se determinó el efecto de neutralización de la gastrina sobre el ratón Min superviviente.

30 Los ratones Min utilizados en el estudio fueron engendrados en la Unidad Académica de Estudios de Cáncer de la Universidad de Nottingham (Reino Unido) en un ambiente C57/BL. Puesto que el estado homocigoto es letal y los ratones Min hembra no secretan leche, se crió un heterocigoto Min con un tipo de hembra salvaje y una descendencia de 1:4 tuvieron el genotipo Min. Los ratones Min positivos fueron colocados a continuación en cada brazo de la terapia sobre una base progresiva.

35 La inmunización con inmunógeno hG17-DT (conjugado de G-17) (Figura 3), es efectiva para la neutralización de los niveles circulatorios de gastrina así como también de precursores de enlace de tejido o de progastrina procesada de forma incompleta.

40 Utilizando anticuerpos anti-G17 exógenos que pueden estar en forma humanizada, un paciente puede ser pre-inmunizado contra la hipergastrinemia o los efectos hipergastrinémicos provocados por el tratamiento con inhibidores de protones (omeprazol, lansoprazol o pantoprazol) o con bloqueadores del receptor H<sub>2</sub> (ranitidina, cimetidina, formatidina o nizatidina). Los anticuerpos humanizados pueden ser preparados mediante técnicas conocidas.

45 El inmunógeno conjugado hG17-DT o el procedimiento para su preparación, se encuentran descritos en la Patente US núm. 5.609.870, Patente US núm. 5.468.494 y Patente US núm. 5.023.077. Véanse también los Ejemplos 3 y 4 que siguen.

El punto final del tratamiento, que ha sido validado previamente por Moser *et al.* (1990), está en la fase terminal de la enfermedad, cuando los ratones tienen una pesada carga con el tumor, se pierde sangre en las deposiciones, y los animales se ponen anémicos.

50 Los ejemplos que siguen se proporcionan únicamente como ilustración.

#### Ejemplo 1

55 La neutralización de la gastrina se consiguió utilizando un inmunógeno, es decir, la preparación de inmunógeno de gastrina, que se compone del dominio amino terminal de gastrina 17 enlazada, por medio de un espaciador de aminoácido, con toxoide de difteria que actúa como portador inmunogénico. Los anticuerpos producidos en virtud del diseño del inmunógeno, reaccionan en cruce con ambas gastrina 17 amidada y extendida en glicina, formas proliferativas conocidas de la gastrina. Los ratones Min fueron inmunizados s.c. con el inmunógeno hG17-DT (100 mg/ratón) en la semana 4, con inyecciones consecutivas a intervalos de 3 semanas. Se sabe que los títulos de anticuerpos serosos aparecen dentro de las 2 semanas de la primera inmunización a niveles con una capacidad de enlace de antígeno de >10<sup>-9</sup>M. El inmunógeno hG17-DT fue administrado a los ratones a una edad de 4 semanas, para examinar el efecto sobre los ratones con una carga tumoral establecida. Los ratones de control recibieron constituyentes inmunógenos sin el péptido activo.

65 La presencia de anticuerpos anti-gastrina en el suero de los ratones inmunizados con inmunógeno de gastrina, fue confirmada utilizando un ensayo de captura ELISA. Para confirmar la presencia de gastrina enlazada al anticuerpo, se tomó suero de los ratones inmunizados, se purificaron complejos de anticuerpo : antígeno, se descomplejaron por ebullición, y se midió la gastrina enlazada mediante RIA.

Los niveles de gastrina enlazada no eran susceptibles de medición en animales inmunizados con 9inmunógeno de control. Los niveles de gastrina enlazada en los ratones inmunizados con inmunógeno de gastrina fueron de 37 pg/ml. En ratones hipergastrinémicos, con un incremento en los niveles de gastrina serosa de 3-4 veces, los niveles de gastrina enlazada eran de 148,3 pg/ml, lo que realza la capacidad de los anticuerpos producidos en el suero para la neutralización de la gastrina (Figura 4).

Existió un efecto significativo sobre la supervivencia, siendo la supervivencia media en el grupo tratado con inmunógeno de control de 8 semanas en comparación con las 15 para los ratones tratados con inmunógeno de gastrina (Figura 5). Prueba de progresión logarítmica = 0,0017. Sin embargo, existe un agudo declive en la supervivencia de los ratones después de 14-15 semanas.

Una hora antes de la terminación, los ratones fueron inyectados con bromodesoxiuridina análoga e ADN con el fin de determinar *in situ* la actividad de proliferación comparativa. Las muestras fueron formalina fijada, parafina incrustada, se cortaron secciones y se mancharon con un anticuerpo de anti-bromodesoxiuridina. No hubo ninguna diferencia significativa en la proliferación de criptas a partir de ambos intestinos delgado y grueso debido al tratamiento con inmunógeno de gastrina (Figura 6). La proliferación de tumores en el intestino delgado fue significativamente inhibida en un 19,8%, mientras que la proliferación de tumores en el intestino grueso fue inhibida en un 41%.

La mucosa colónica normal es sensible a los efectos proliferativos de la hipergastrinemia incluyendo ambas gastrina amidada y progastrina (Wang, *et al.*, 1997; Renga *et al.*, 1997). Los ratones APC1638 y Min (ambos tienen mutaciones en su gen APC) tienen un gen de gastrina activada en ambas mucosas colónica normal y maligna, a diferencia con los correspondientes ratones de tipo salvaje. Los ratones Min tienen mayores niveles de proliferación en la mucosa normal cuando se comparan con el ratón C57/BL de tipo salvaje.

La hipergastrinemia inducida por tratamiento con altas dosis diarias de omeprazol reduce la supervivencia de los ratones Min, lo que se invierte parcialmente cuando se co-administran con inmunógeno de gastrina. Existe una ventana inicial de 2 semanas cuando la hipergastrinemia no tiene oposición debido a la carencia de anticuerpos de anti-gastrina. Este efecto se invierte completamente cuando el tratamiento con omeprazol se retarda durante 2 semanas, permitiendo que los títulos de anticuerpo de anti-gastrina se muestren con anterioridad al comienzo de la hipergastrinemia.

La administración de inmunógeno de gastrina no tiene ningún efecto sobre la supervivencia de los ratones de edad avanzada (6-12 semanas). Sin embargo, existe un efecto significativo sobre la supervivencia de ratones inmunizados a una edad temprana (4 semanas). Por lo tanto, los resultados sugieren una fase por la que pasan los ratones, y después de la cual el efecto anti-proliferativo no es suficiente para suprimir la progresión maligna. Los ratones objeto podrían responder así a la gastrina asociada al suero hasta el comienzo de la vía autocrina de gastrina a una edad más tardía que puede ser más refractaria a los anticuerpos inducidos por inmunógeno de gastrina.

Cuando el inmunógeno de gastrina se proporcionó 2 semanas antes del tratamiento con omeprazol, se observó una inversión completa del efecto de supervivencia de la hipergastrinemia inducida con omeprazol en los ratones Min. Esto se confirmó cuando se demostró que el grupo tratado con omeprazol + inmunógeno de gastrina no era significativamente diferente del control de vehículo ( $p = 0,1103$ ).

Los anticuerpos Anti-G17 habían demostrado anteriormente ser detectables en ratones Min de 4 semanas de edad a las 2 semanas (Figura 5) después de la inmunización con inmunógeno de gastrina. La determinación de los niveles de anticuerpo anti-G17 a la terminación del estudio revelaron una variación en ambos grupos según se midió mediante absorbancia específica utilizando un ensayo ELISA. Se observó alguna supresión de los niveles de anticuerpos anti-G17 en los ratones co-tratados con omeprazol, debido a la neutralización de la hipergastrinemia inducida con omeprazol (Figura 8,  $p = 0,02$ , Mann Whitney, comparando los niveles de anticuerpo anti-G17(1-9):DT en el vehículo y en los grupos tratados con omeprazol).

Los datos de anticuerpo anti-G17(1-9):DT del ratón Min han sido ilustrados en la Figura 8. La medición de los niveles de gastrina serosa carboxi-amidada libre y enlazada en animales inmunizados, reveló un nivel medio de gastrina libre de 28,9 pg/ml y un nivel enlazado de 36,7 pg/ml (Figura 9).

En los ratones tratados con inmunógeno de gastrina + omeprazol, el nivel de gastrina libre fue de 45,6 pg/ml (incremento de 1,5 veces en comparación con animales inmunizados con inmunógeno de gastrina solamente,  $p = 0,0135$ , Mann Whitney). El nivel de gastrina enlazada en los ratones tratados con inmunógeno de gastrina + omeprazol fue de 148,3 pg/ml, el cual se incrementó significativamente cuando se compara con los animales tratados con inmunógeno de gastrina solamente (2 animales tenían niveles de gastrina enlazada mayores de 200 pg/ml),  $p = 0,00001$  cuando se compara con los niveles de gastrina enlazada del grupo tratado con inmunógeno de gastrina, y  $p = 0,00001$  cuando se compara con los niveles de gastrina libre en el grupo tratado con inmunógeno de gastrina + omeprazol, [Mann Whitney]. Los datos de suero G17 del ratón Min han sido ilustrados en la Figura 9. Los datos se muestran en la Tabla 1.

## ES 2 286 883 T3

TABLA 1

5	Grupo	Media	SD	Estadística (Mann Whitney)
	1.	28,9	12,7	1 frente a 2 p = 0,191
	2.	36,7	15,4	1 frente a 3 p = 0,0135
	3.	45,6	19,2	2 frente a 4 p = 0,00001
10	4.	148,3	170,9	3 frente a 4 p = 0,00001

El inmunógeno G17-DT administrado en solitario indujo un efecto significativo sobre la supervivencia (Figura 10, p = 0,0017). El efecto sobre la supervivencia fue más grande en la fase inicial del experimento, siendo con el tiempo de hasta el 50% de supervivencia a las 9,5 semanas para el control de vehículo y de 14,5 semanas para los tratados con inmunógeno. El inmunógeno G17-DT solamente indujo este efecto beneficioso sobre la supervivencia hasta la semana 14, a continuación de la cual se produjo una caída exponencial.

### Ejemplo 2

Según se describe en lo que sigue, el efecto de la hipergastrinemia inducida por omeprazol en la progresión de la neoplasia intestinal fue estudiada adicionalmente en el modelo de poliposis coli del ratón Min (neoplasia intestinal múltiple).

Los ratones de genotipo Min<sup>+</sup> confirmado fueron aleatorizados en 4 grupos:

- 25 Grupo 1. Tratamiento oral diario OME de 75 mg/kg diarios
- Grupo 2. Dosis oral OME + GSI de 100 mg/ratón día 0 y cada 3 semanas
- 30 Grupo 3. Vehículo oral + inmunógeno de control
- Grupo 4. Vehículo oral - inmunógeno de control

Se midió el nivel de gastrina de suero mediante RIA. Con anterioridad a finalizar el tratamiento, se determinó el índice proliferativo mediante el método de bromodesoxiuridina.

- 35 Grupo 1. 236 pg/ml de gastrina de suero
- Grupo 4. 67 pg/ml de gastrina de suero

La hipergastrinemia del grupo 1 redujo significativamente la supervivencia en comparación con el control (p = 0,00001, prueba de progresión logarítmica) con ratones del grupo de control que tienen el 50% una supervivencia de 16 semanas en comparación con las 8 semanas del grupo tratado con omeprazol. El inmunógeno hG17-DT indujo la formación de anticuerpos serosos con una capacidad de enlace de antígeno >20 mg/ml dando como resultado una neutralización eficaz del estado de hipergastrinemia. La neutralización de la gastrina dio como resultado una inversión de la desventaja de supervivencia inducida por el omeprazol (p = 0,0017).

Los ratones hipergastrinémicos tuvieron una proliferación incrementada de mucosa colónica normal. Se encontró que el 9,46% de células proliferantes se incrementó hasta el 20,1%, p<0,05, Mann-Whitney y neoplasia colónica (22,3% se incrementó al 35,0%, p<0,01). De ese modo, el nivel de esta hipergastrinemia experimental estuvo en la gama alcanzada en los humanos sobre una dosis de mantenimiento de omeprazol y dio como resultado una progresión incrementada a través de la secuencia adenoma : carcinoma. Además, se confirmó la gastrina como el mediador que induce un estado de hiper-proliferación tanto en el epitelio normal como en el colónico neoplástico. Estos datos demuestran la necesidad y la efectividad de controlar la hipergastrinemia sobre el colon pre-maligno mediante inmunización con inmunógeno de gastrina.

Se han establecido carcinomas polipoides *in vitro* a partir del intestino grueso y del delgado en ratones Min. La proliferación fue comprobada mediante un ensayo ELISA colorimétrico a base de tetrazolio. Se encontró que la proliferación de ambos tipos de tumor no se incrementaba con la gastrina amidada, pero el tumor del intestino grueso fue simulado modestamente con la gastrina extendida con glicina.

La inmunización con inmunógeno de gastrina afecta significativamente la supervivencia de ratones Min cuando se administra tempranamente en su duración de vida. Además, el índice de proliferación de tumores en el intestino grueso fue inhibido más extensamente por el inmunógeno G17-DT que el de los tumores que se presentan en el intestino delgado. En este contexto, los tumores del intestino grueso de los ratones Min parecen ser más sensibles a los efectos proliferantes del GlyG17 que los tumores del intestino delgado. Esto podría ser tanto para el G17 asociado al suero como para el asociado al tumor, debiéndose este último a la activación del gen de gastrina en estos tumores.

## ES 2 286 883 T3

La inhibición inmunológica mediante inmunógeno G17-DT en la fase terminal de la secuencia adenoma : carcinoma, no fue tan efectiva. Puesto que los del intestino delgado son los más prolíficos en términos de número y de carga total de tumor, un efecto inhibitorio sobre la proliferación de menos de un 20% discutido anteriormente, puede no ser suficientemente grande para estabilizar la progresión.

Así, está claro que los resultados descritos en lo que antecede conducen a las siguientes conclusiones:

1. El ratón MIN sobre-expresa el gen de poliposis coli adenomatosa (APC), la mutación aparentemente responsable de la formación de adenoma en una fase pre-cancerígena.

2. Los adenomas son sensibles a la estimulación de gastrina, especialmente en fases tempranas y/o en ratones jóvenes.

3. La administración de inhibidores de bomba de protones o bloqueados H<sub>2</sub> según se ha descrito, causa hipergastrinemia, hiperproliferación adenosa y supervivencia consiguientemente acortada.

4. La inmunización contemporánea con el omeprazol invierte parcialmente el efecto pernicioso sobre la supervivencia. La inmunización con inmunógeno G17-DT 2 semanas antes de la administración de inhibidor de bomba de protones da como resultado la inversión completa de los efectos perniciosos sobre el medicamento. En este régimen, la elevación de los títulos de anticuerpo coincidió con el inicio del tratamiento con inhibidor de bomba de protones.

El tratamiento con el inmunógeno G17-DT según se ha descrito, es útil en la inversión de los estados híper gástricos inducidos por una diversidad de condiciones, incluyendo PA, *H. pylori*, gastritis atrófica, gastrectomía total o parcial, tratamiento con inhibidores de bomba de protones o bloqueadores de H<sub>2</sub>. El inmunógeno G17-DT es potencialmente efectivo para la protección de los mamíferos, incluyendo los humanos, respecto a la inducción de cánceres en respuesta a la gastrina (colon, estómago, páncreas, e hígado).

La inmunización contra la gastrina de acuerdo con el presente procedimiento de utilización de hG17-DT induce una respuesta inmune efectiva en humanos de tal modo que reduce los niveles de gastrina de suero en pacientes hipergastrinémicos a niveles normales o más bajos.

El tratamiento de pacientes PA que presentan hipergastrinemia con inmunización (activa o pasiva) contra la gastrina, puede ser aplicado por sí solo o en combinación con una etapa secundaria de administración de ácido anti-gástrico, inhibidores de bomba de protones tales como omeprazol o lansoprazol, así como también agentes de bloqueo de receptor H<sub>2</sub>, tales como ranitidina, cimetidina, formatidina o nizatidina.

### Ejemplo 3

Los inmunógenos capaces de inducir respuestas inmunes específicas al G17 o al G34, fueron preparados mediante procedimientos estándar de síntesis de estado sólido. Cada péptido fue caracterizado en cuanto a contenido de aminoácido y a pureza.

Se sintetizaron péptidos con las siguientes secuencias de aminoácido:

Péptido 1 - G17 humano (1-6)(“hG17(6)”: pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis

Péptido 2 - G17 humano (1-5)(“hG17(5)”: pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis

Péptido 3 - G17 humano (1-4)(“hG17(4)”: pGlu-Gly-Pro-Trp-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis

Péptido 4 - G17 de rata (1-6)(“rG17(6)”: pGlu-Arg-Pro-Pro-Leu-Glu-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis

Péptido 5 - G34 humano (1-6)(“hG34(6)”: pGlu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis

Péptido 6 - G34 humano (13-22)(combinación “hG34/G17”): Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-pro-pro-pro-Cis

Cada uno de estos péptidos se conjugó con grupos amino presentes en un portador tal como toxoide Diphtheria (“DT”) por medio del residuo cisteína de péptido terminal utilizando agentes de enlace heterobifuncionales que contenían un éster succinimidil en un extremo y maleimida en el otro extremo del agente de enlace.

Para realizar el enlace entre cualquiera de los péptidos 1-6 anteriores y el portador, el péptido seco fue disuelto en Amortiguador de Fosfato de Sodio 0,1M, pH 8,0, con un exceso molar de treinta de ditiotreitil (“DTT”). La solución fue agitada bajo atmósfera de gas nitrógeno saturada de agua durante cuatro horas. El péptido que contenía cisteína reducida fue separado de los otros componentes mediante cromatografía sobre una columna Sephadex G10 equilibrada con ácido acético 0,2M. El péptido fue liofilizado y almacenado bajo vacío hasta que fue utilizado. El portador fue activado mediante tratamiento con el agente de enlace heterobifuncional, por ejemplo, éster N-hidroxisuccinimida de ácido Epsilon-maleimidocaproico, (“EMCS”), en proporciones suficientes como para conseguir la activación de

## ES 2 286 883 T3

aproximadamente 25 grupos amino libres por  $10^5$  de peso molecular de portador. En el caso específico del toxoide de difteria, esto ascendió a la adición de 6,18 mg de EMCS (pureza del 75%) por cada 20 mg de toxoide de difteria.

La activación del toxoide de difteria se realizó disolviendo cada 20 mg alícuotas de toxoide de difteria en 1 ml de Amortiguador de Fosfato de Potasio 0,2M, pH 6,45. Alícuotas de 6,18 mg de EMCS fueron disueltas en 0,2 ml de Dimetil Formamida (“DMF”). Bajo condiciones de oscuridad, el EMCS fue añadido gota a gota en cantidades de 50 microlitros (“ $\mu$ l”) al DT con agitación. Tras 2 horas de incubación en oscuridad, la mezcla fue cromatografiada sobre una columna Sephadex G50 equilibrada con amortiguador de Citrato de Sodio 0,1M, pH 6,0, que contenía 0,1 mM EDTA.

Las fracciones que contenían el toxoide de difteria activado con EMCS, fueron concentradas sobre una membrana de ultrafiltrado PM 10 bajo condiciones de oscuridad. El contenido de proteína del concentrado fue determinado mediante uno u otro de los métodos de Lowry o de Bradford. El contenido de EMCS del portador fue determinado por incubación del portador activado con cisteína-HCl seguido de reacción con 10 mM de Reactivo de Elman, 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) 10 mM. La diferencia de densidad óptica entre un tubo en blanco que contenía la cisteína-HCl y el tubo de muestra que contenía la cisteína-HCl y el portador, fue trasladada al contenido del grupo EMCS utilizando el coeficiente de extinción molar de  $13,6 \times 10^3$  para el 5-tio-2-ácido nitro benzoico a 412 nm.

El contenido de cisteína reducida (-SH) del péptido, fue determinado también utilizando Reactivo de Elman. Aproximadamente 1 mg de péptido se disolvió en 1 ml de agua saturada en gas nitrógeno, y una alícuota de 0,1 ml de esta solución se hizo reaccionar con el Reactivo de Elman. Utilizando el coeficiente de extinción molar del ácido 5-tio-2-nitro-benzoico ( $13,6 \times 10^3$ ), se calculó la cisteína-SH libre. Una cantidad de péptido que contenía suficiente -SH libre para reaccionar con cada uno de los 25 grupos amino activados con EMCs sobre el portador, se disolvió en Amortiguador de Citrato de Sodio 0,1M, pH 6,0, que contenía 0,1 mM EDTA, y se añadió gota a gota al portador activado con EMCS bajo condiciones de oscuridad. Una vez que la solución de péptido hubo sido añadida al portador, la mezcla fue incubada durante la noche en oscuridad bajo atmósfera de gas nitrógeno saturada de agua.

El conjugado del péptido enlazado al portador a través del EMCS, se separó de los otros componentes de la mezcla mediante cromatografía sobre una columna Sephadex G50 equilibrada con Bicarbonato de Amonio 0,2M. El conjugado eluido en el volumen vacío de la columna, se liofilizó y se almacenó desecado a 20°C hasta su utilización.

El conjugado se caracterizó en cuanto a contenido de péptido mediante un número de procedimientos conocidos por los expertos en la materia incluyendo la ganancia de peso, el análisis de aminoácido, etc. Se determinó que los conjugados de estos péptidos y toxoide de difteria producidos mediante estos procedimientos tenían 20-25 moles de péptido por  $10^5$  de portador y todos fueron considerados adecuados como inmunógenos para la inmunización de los animales de ensayo.

### Ejemplo 4

El péptido hG17(1-9)-Ser9 fue preparado mediante métodos estándar de síntesis de estado sólido. Ese péptido contiene un inmunomímico amino terminal de hG17 formado mediante un espaciador de carboxi terminal. Este péptido comprende un inmunomímico de 9 aminoácidos del hG17 (pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu) seguido del espaciador “Ser” (-Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Cis) unido al aminoácido número 9 del inmunomímico hG17.

El péptido fue conjugado en los grupos amino presentes en el portador inmunogénico de Diphtheria Toxoid (“DT”) por medio del residuo de cisteína de péptido terminal utilizando agentes de enlace heterobifuncionales que contienen un éster de succinimidilo en un extremo y maleimida en el otro extremo del agente de enlace, esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Las construcciones inmunogénicas de esta invención incluyen un péptido (1-9)G17 amino terminal o un péptido (1-6)G34 amino terminal conjugado por medio de un espaciador de péptido en un portador inmunogénico. La secuencia G17 preferida es la pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu, y la secuencia G34 preferida es la pGlu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Arg-Pro-Pro-Pro-Cis. El espaciador preferido en ambas construcciones es un Ser-péptido (Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Pro-Cis). El portador inmunogénico preferido es toxoide de difteria, toxoide de tétanos, keylimpet hemocianina, y albúmina de suero bovino (BSA). El inmunógeno de gastrina se define como un conjugado de la secuencia de péptido pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu, con un espaciador de aminoácido enlazado a un portador inmunogénico. El inmunógeno de gastrina preferido se define como un conjugado del péptido (1-9) (p-Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu) amino terminal que está enlazado por medio del espaciador de péptido al toxoide de difteria.

### Ejemplo 5

Estos experimentos demuestran que el inmunógeno induce antisueros que se enlazan al G17 amidado y al G17 de glicina extendida, pero no al G34. Específicamente, este experimento demuestra la especificidad de gastrina de un antisuero producido por la inmunización anti-G17 de los conejos.

Los antisueros fueron absorbidos sobre una fase sólida a una concentración de 100  $\mu$ g/ml y el desplazamiento fue determinado en un ensayo competitivo con una concentración fija de G17 radioetiquetado (100 pg/ml) y concentraciones crecientes de ligandos no etiquetados (1-25.000 pg/ml).

## ES 2 286 883 T3

Las Figuras 11 y 12 muestran el desplazamiento del [<sup>125</sup>I]G17 del antisuero G-17 anti-humano de conejo, mediante G17, G17-Gly y G34. El antisuero utilizado en la prueba mostrado en la Figura 11, fue obtenido a partir de animales inmunizados con G17(1-9):DT y era específico para el extremo N-terminal del G17; El antisuero de la Figura 12 era específico para el extremo C-terminal del G17. El G17 desplazó el G17 radioetiquetado de ambas preparaciones de antisuero con una concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) de 3500 pg/ml para el G17(1-9):DT anti-humano de conejo (N-terminal) y 800 pg/ml para el anti-G17 de conejo (C-terminal). El G17 extendido en glicina no desplazó el G17 radioetiquetado del antisuero específico C-terminal, pero lo hizo desde el antisuero específico N-terminal (C<sub>25</sub> 12.000 pg/ml), demostrando que el G17 extendido en glicina se enlaza con el antisuero específico N-terminal, pero no con el antisuero específico N-terminal, demostrando la especificidad del antisuero G17(1-9):DT para el G17 extendido en glicina y no para el G34.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de (i) una composición inmunogénica que comprende un péptido G17 de -pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu- y (ii) un agente anti-úlceras seleccionado en el grupo consistente en un bloqueador del receptor de histamina y en un inhibidor de bomba de protones, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hipergastrinemia en un mamífero.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha hipergastrinemia está asociada a: a) una condición elegida en el grupo consistente en anemia perniciosa, un tumor gástrico, un cáncer gástrico, o b) el curso de una terapia con una sustancia que da como resultado niveles de gastrina incrementados.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido está conjugado con un portador inmunogénico.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido G17 de pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu- está enlazado por medio de un espaciador de aminoácido a un portador inmunogénico.
- 20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho portador inmunogénico se selecciona en el grupo consistente en toxoide de difteria, toxoide de tétanos, y keylimpet hemocianina.
- 25 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición (1) induce anticuerpos anti-gastrina que se enlazan a la gastrina.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos anticuerpos se enlazan a la heptadecagastrina G17.
- 30 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho bloqueador se elige en el grupo consistente en ranitidina, cimetidina, famotidina, y nizatidina.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor se elige en el grupo consistente en omeprazol, lansoprazol y pantoprazol.
- 35 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en el que dicha composición inmunogénica se administra a dicho mamífero con anterioridad a dicho agente.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en el que dicha composición y dicho agente son co-administrados a dicho mamífero.
- 40 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha hipergastrinemia es un efecto colateral de dicho agente anti-úlceras.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los niveles de gastrina de suero de dicho mamífero se mantienen a un nivel normal.
- 45 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que se inhibe la producción de ácido gástrico de dicho mamífero.

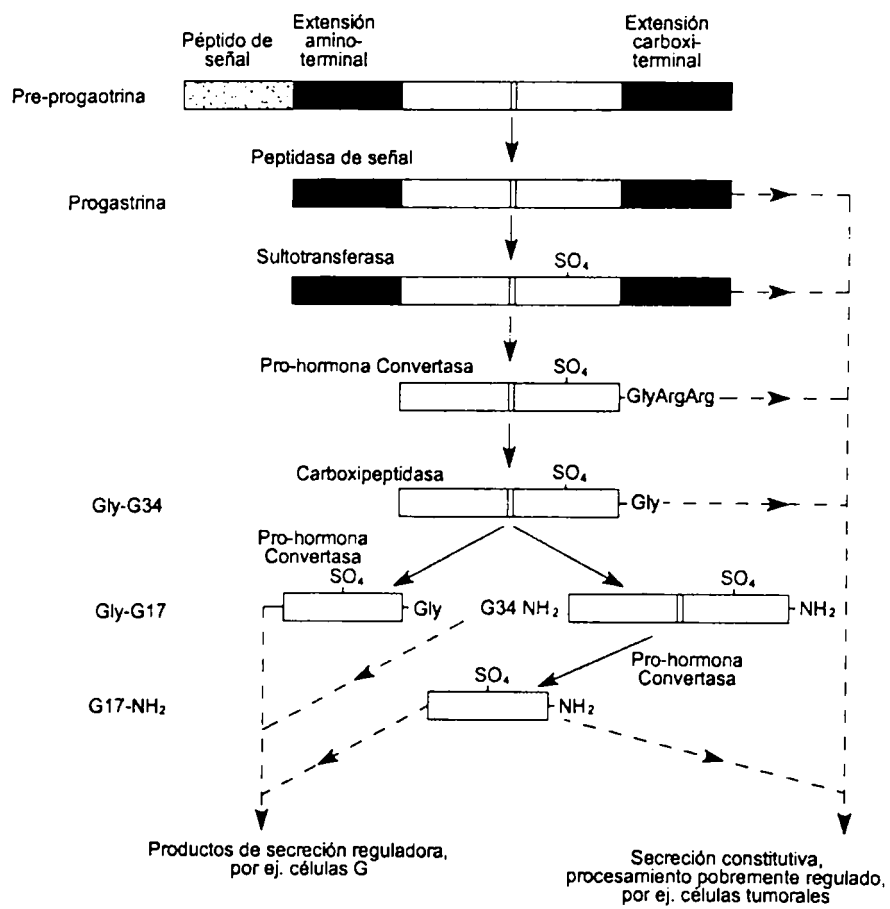
50

55

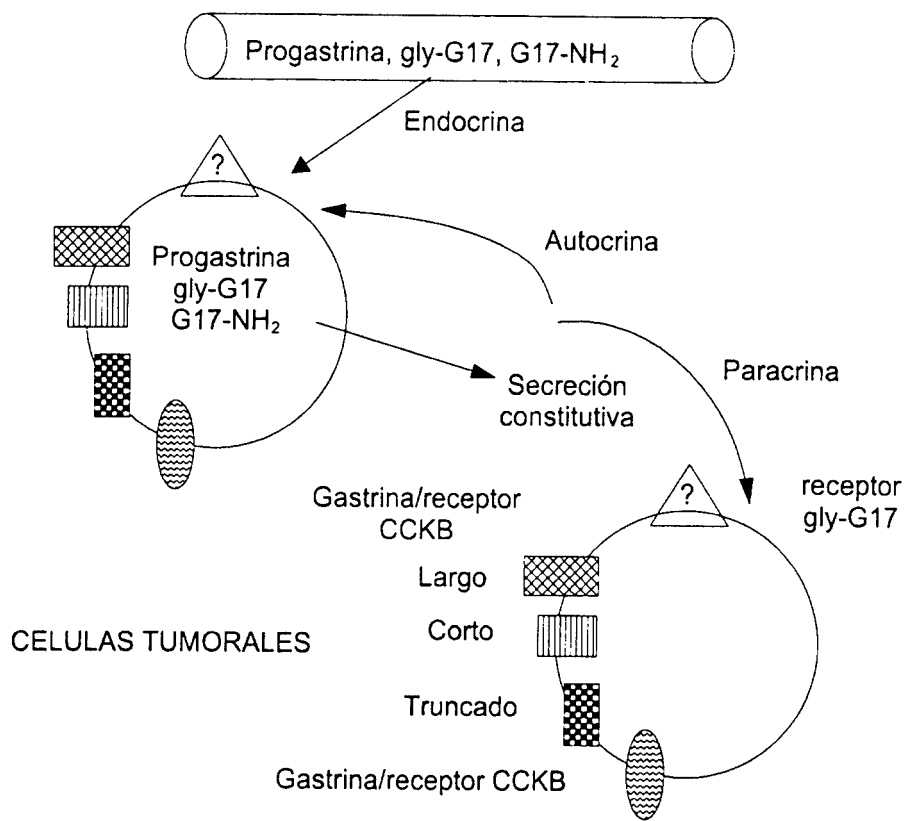
60

65

70



**FIG. 1**



**FIG. 2**

FIG. 3

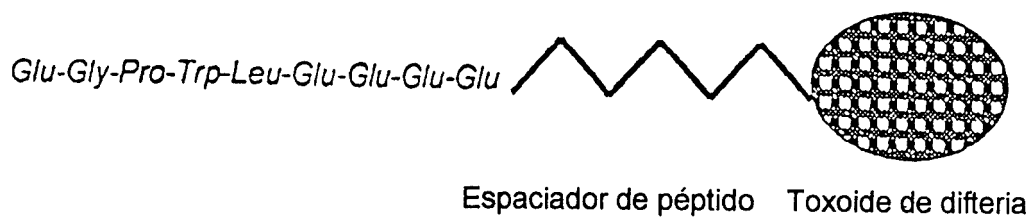
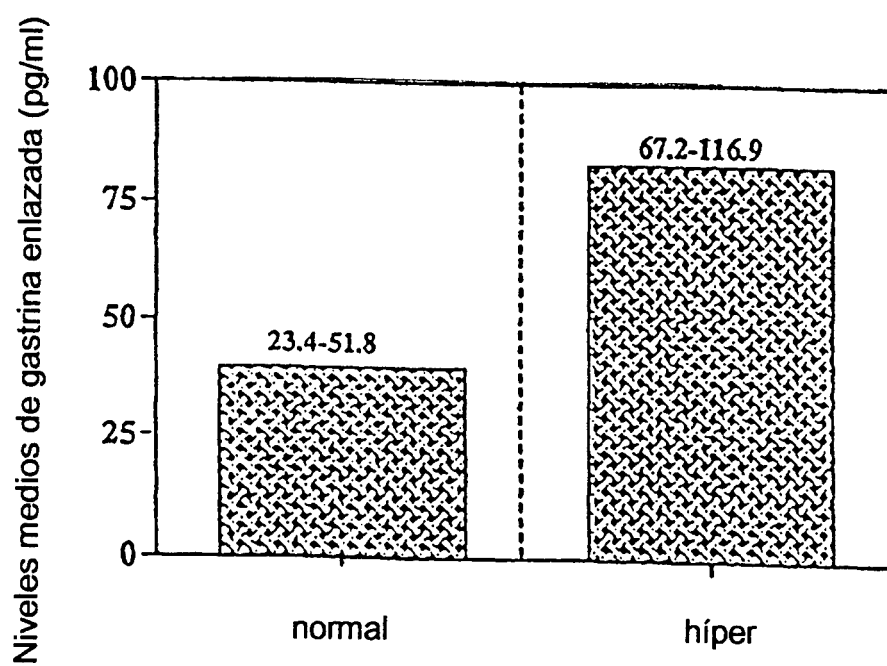
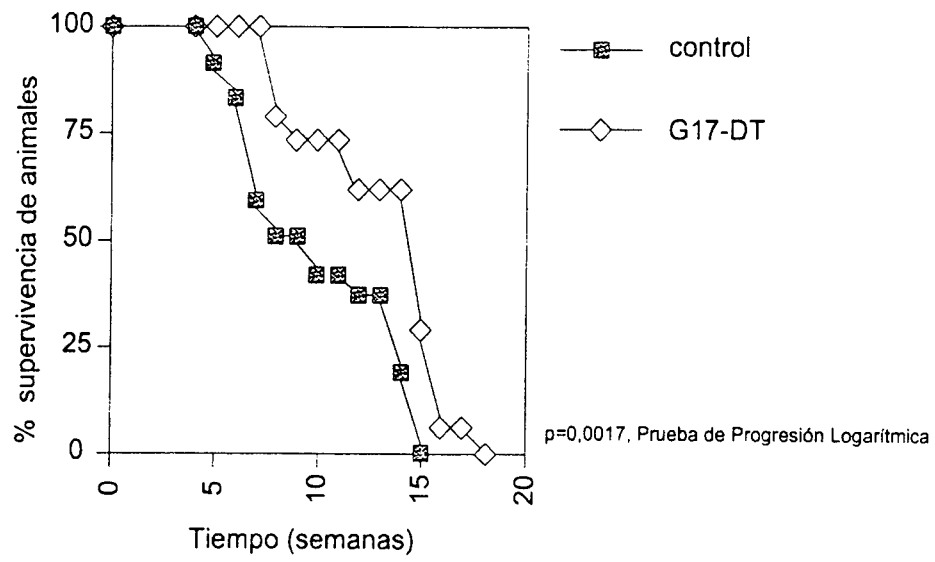


FIG. 4





**FIG. 5**

**FIG. 6****ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN MEDIA (%)**

Grupo	Intestino Delgado		Intestino Grueso	
	Criptas	Tumor	Criptas	Tumor
Vehículo	6,45 (1,9)	33,3 (6,6)	6,05 (2,7)	43,2 (10,5)
G17-DT	5,87 (0,8)	26,7 (5,1)	5,80 (2,5)	25,6 (7,6)
		p<0,005		p<0,0000

Anti GA (1-9) temporizado; anticuerpo DT en ratón Min.

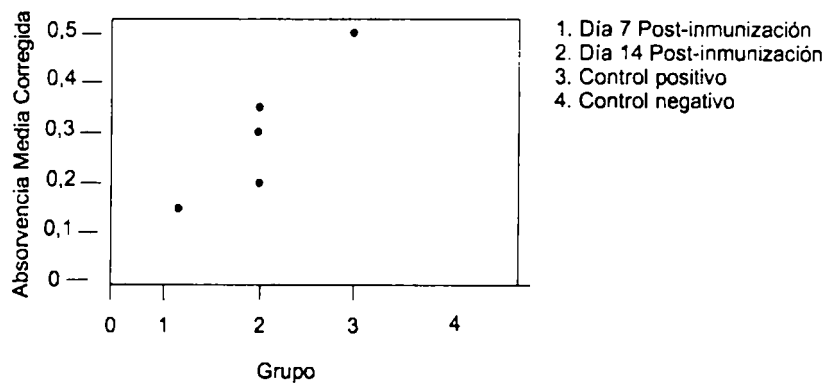
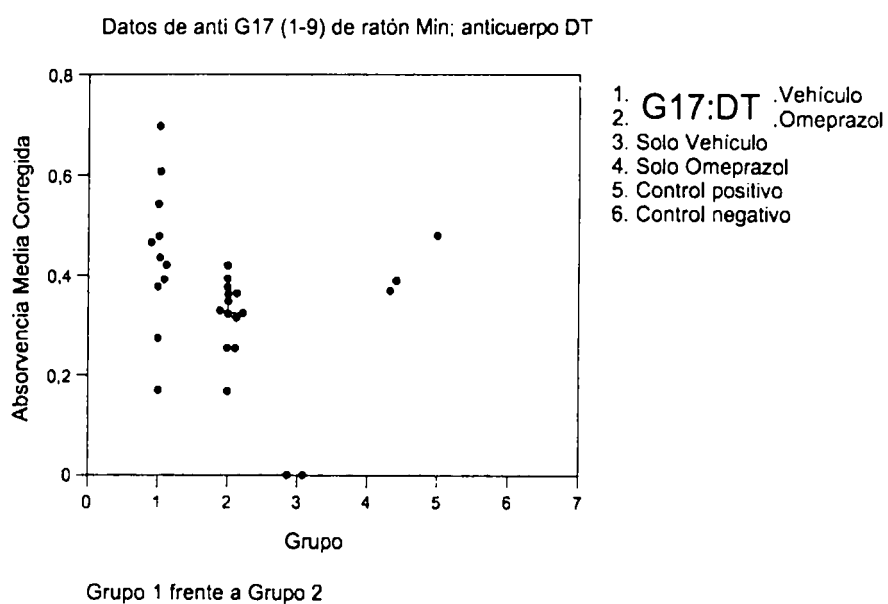


FIG. 7



**FIG. 8**

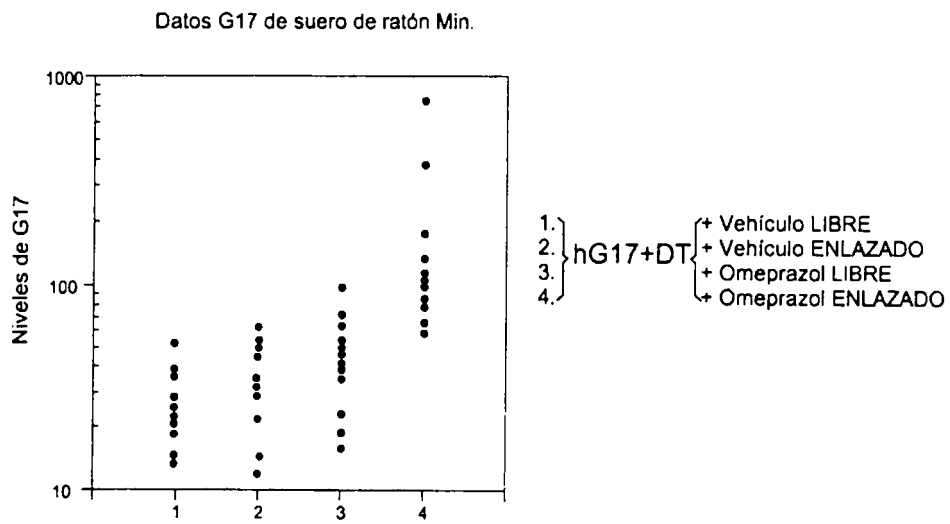
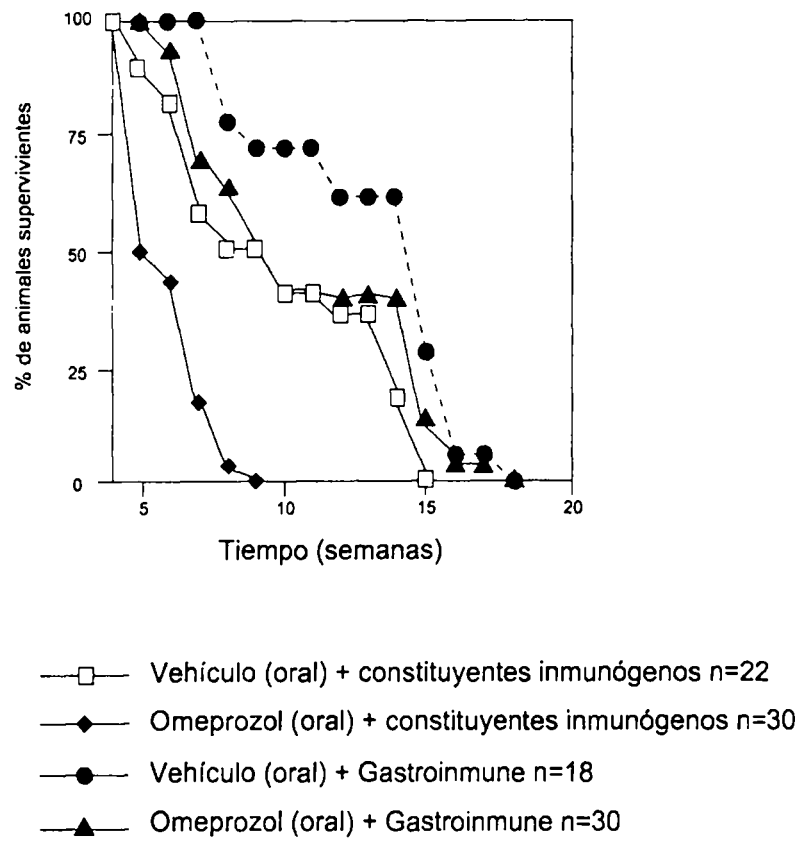
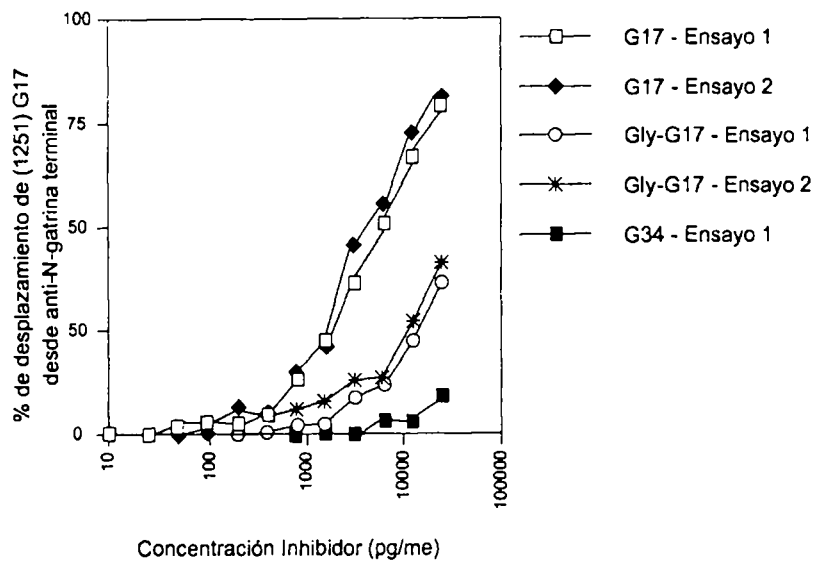


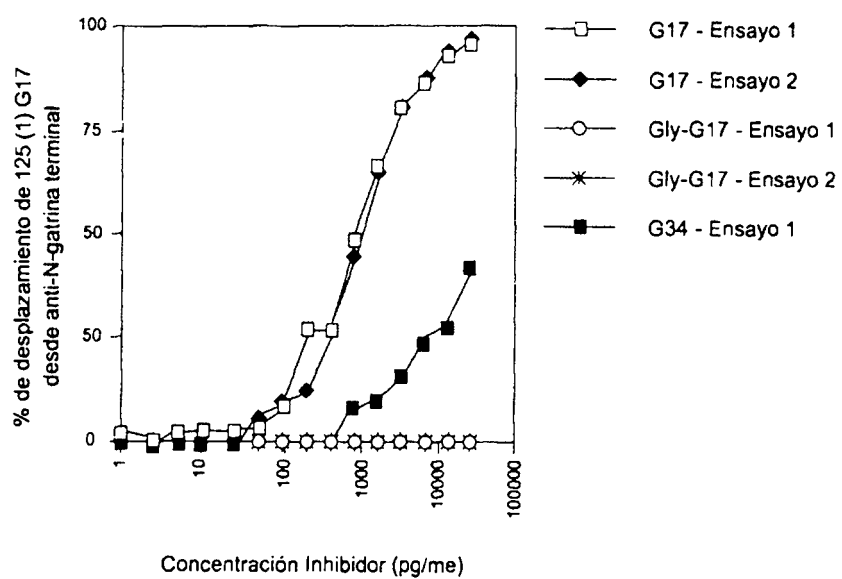
FIG. 9



**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**

# ES 2 286 883 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> APHTON CORPORATION  
5 <120> Prevención y Tratamiento de Hipergastrinemia  
<130> 1102865-0035  
<140> US  
<141> 1999-05-14  
10 <150> US 60/085, 714  
<151> 1999-05-15  
<160> 4  
<170> PatentIn Ver. 2.0  
15 <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
20 <213> humano o sintético  
<220>  
<221> MOD RES  
<222> (1)  
25 <223> ácido piroglutámico  
  
<400> 1  
30       Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu  
          1                           5  
  
<210> 2  
35 <211> 12  
<212> PRT  
<213> péptido humano o sintético  
<220>  
40 <221> MOD\_RES  
<222> (1)  
<223> ácido piroglutámico  
45 <400> 2  
  
          Glu Leu Gly Pro Gln Gly Arg Pro Pro Pro Pro Cis  
          1                           5                           10  
50  
<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético  
60 <400> 3  
  
          Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cis  
          1                           5  
65  
<210> 4  
<211> 7

# ES 2 286 883 T3

<212> PRT

<213> péptido humano o sintético

<220>

5 <221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> AMIDACIÓN

10

<400> 4

Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp  
1 5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65