

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 107482 A
7(51) A 61 K 39/00

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

A 61 P 35/00

A 61 P 37/04

C 12 N 5/08

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107482 (22) Заявено на 21.01.2003 (24) Начало на действие на патента от: Приоритетни данни (31) 00116362 (32) 28.07.2000 (33) EP (41) Публикувана заявка в бюлетин № 11 на 28.11.2003 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници: (62) Разделена заявка от рег. №	(71) Заявител(и): LIPONOVA GMBH, HANNOVER (DE) (72) Изобретател(и): Claudia Ulbrich, Hannover Klaus-Dieter Rockensuss, Fritzlar Armin Grossmann, Hannover (DE) (74) Представител по индустриална собственост: Георги Цветанов Перев, 1124 София, ул. "Леонардо да Винчи" 3 (86) № и дата на РСТ заявка: PCT/EP01/08455, 21.07.2001 (87) № и дата на РСТ публикация: WO02/09745, 07.02.2002
--	---

(54) ЛЕКАРСТВЕНО СРЕДСТВО ЗА ИМУНОТЕРАПИЯ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ТУМОРИ

(57) Изобретението се отнася до състав, който може да бъде прилаган като лекарство средство или за получаване на лекарство средство за имунотерапия на тумори, или за противотуморна ваксинация. Изобретението се отнася също до методи за получаване на лекарствени средства за имунотерапия на тумори или за противотуморна ваксинация.

16 претенции

BG 107482 A

2434/03-ГП

ЛЕКАРСТВЕНО СРЕДСТВО ЗА ИМУНОТЕРАПИЯ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ТУМОРИ

Област на техниката

Настоящата заявка се отнася до състави, които са особено подходящи за имунотерапия на злокачествени тумори, до методи за тяхното получаване и до приложението на съставите за производство на лекарствени средства.

Предшестващо състояние на техниката

Обикновено терапевтичното лечение на туморите се извършва чрез радикална хирургия, химиотерапия, лъчелечение или хормонално лечение. Тези терапии имат множество нежелани странични ефекти и са съпроводени със значително натоварване на пациента. Нещо повече, при някои туморни форми почти не се постига подобрение с тези видове лечение, така че тяхното приложение не изглежда оправдано по отношение на страничните ефекти. Тези туморни форми включват най-вече злокачествените тумори, злокачествените меланоми, бъбречните карциноми, чревните карциноми и панкреатичните карциноми. Поради това, смъртността, например при бъбречни карциноми, е 85%.

В последните години нараснаха познанията за комплексното взаимодействие между туморите и имунната система, като интересът бе фокусиран върху стратегиите за лечение на тумори, при които се стимулира имунната система. Общо, обектът на такива терапии е да се

накара имунната система да разпознае специфични антигени от туморните клетки, които не са налични в здравите клетки, или пък са налице, но в по-ниско съдържание. Това се постига, например, чрез приложение на лекарствено средство, както е описано в Anticancer Research [(1997) No. 17, стр. 2879-2882 и 3117-3120]: туморната тъкан се отстранява от пациента и се преработва до автоложен лизат от туморни клетки, който се инжектира на пациента. Това се извършва с очакването, че имунитетът срещу туморните антигени се осигурява чрез лизата. Друга стратегия е описана в публикуваната патентна заявка WO-A 99/47687. В нея се разкрива, че автоложните антиген-съдържащи клетки, експресиращи специална туморна детерминанта по повърхността си, се инжектират на пациента.

Обект на противотуморните терапии е не само предотвратяването нарастването на тумора и образуването на метастази, но и предизвикване на неговото обратно развитие. Очакванията на пациента са за удължаване на живота и за подобряване на неговото здраве и качество на живот. За успеха на имунните терапии понастоящем може да се каже, че прилаганите терапевтични лечения за жалост могат да постигнат успех само в единични случаи или само частично. Основен проблем е фактът, че много туморни маркери се намират също така и в здрави клетки в определени етапи от диференцирането им, както и в определени количества. Поради това, активацията на имунната система срещу такива туморни маркери често не настъпва в желаната степен или с необходимата специфичност.

Обект на настоящото изобретение е да се разработят лекарствени средства за лечение на тумори, които да постигат до голяма степен горепосочените цели. Също така, когато се прилагат

лекарствените средства съгласно изобретението, би било възможно да се провежда лечение на тумори относително бързо и просто.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до състав за имунотерапия на тумори. Съставът може да бъде получен чрез метод, при който туморен материал се изследва, стрива и превръща в пречистена клетъчна суспензия, която след това се инкубира с интерферон-гама и токоферол ацетат и се замразява до образуване на туморно-клетъчен лизат, в който моноцитите се изолират от левкоцитния слой или цялостната кръв, след това се индуцира диференцирането им в дендритни клетки чрез инкубация с цитокини, преминават в неадхерентен стадий, след което изчислено количество от горепосочения туморно-клетъчен лизат се размразява, добавя се антиген, добавят се цитокини, извършва се инкубация и се събират получените зрели дендритни клетки.

“Изследване” на туморния материал означава макроскопска оценка на тъканта, при която ясно видимите участъци от мастна, съединителна и функционална бъбречна тъкан, кръвоносни съдове и други не-туморни тъкани се идентифицират и след това се отстраняват и изхвърлят.

В особено изпълнение автоложният туморен материал се използва за производство на състава. Когато съставът е произведен, IL-4 (интерлевкин-4) и GM-CSF (гранулоцитно-макрофагеален колония-стимулиращ фактор), и/или IFN- γ (гама-интерферон) се добавят предпочитано към незрелите дендритни клетки за диференциране.

Съставът съгласно изобретението е особено подходящ като лекарство средство или за изготвяне на лекарство средство за имунотерапия. Медикаментите, съдържащи клетъчния лизат съгласно изобретението, предпочитано се инжектират вътрекожно или подкожно.

Всички възможни видове солидни туморни заболявания могат да бъдат лекувани с лекарственото средство съгласно изобретението. Медикаментите, съдържащи състава съгласно изобретението, са особено подходящи за лечение на тумори, при които други лечебни методи са с малък успех. В частност, в допълнение към злокачествените солидни тумори, те включват злокачествените меланоми, бъбречните карциноми, чревните карциноми, панкреатичните карциноми, лимфомите, бронхиалните карциноми и гинекологичните тумори.

Когато пациенти са лекувани с медикамента съгласно изобретението в рамките на противотуморното лечение, неочаквано са наблюдавани положителни ефекти за пациентите. Растежът на туморите и образуването на метастази могат да бъдат предотвратени до изненадващо висока степен, като успоредно се подпомага обратното развитие на туморите. Здравето, качеството на живот и очакванията за живота на пациентите са били явно увеличени. Тези ефекти могат да бъдат постигнати вероятно поради това, че лекарственото средство от изобретението е различно от известните медикаменти в основните си аспекти. Една значима разлика от многото познати методи е тази, че туморните маркери не просто се прилагат при пациента, но директно се включват в имунната система на пациента чрез дендритните клетки, служещи като носители. Изненадващо е било установено, че е достатъчно да се добави суров клетъчен лизат от туморни клетки към дендритните клетки *in vitro*, докато съгласно WO-A-99/47687 антиген-

съдържащите клетки се смесват или трансфектират с пречистен антиген. Поради това, методът съгласно изобретението може да бъде извършен по-бързо и по-просто в сравнение с известните методи. Това е особено важно в изготвянето на такива терапевтични субстанции поради необходимостта да се поддържа нисък риск от контаминации. В допълнение, клетъчният лизат има предимството, че е наличен целият антигенен репертоар на туморната клетка.

Настоящото изобретение се отнася също до методи за получаване на лекарствено средство, при които се изготвя суспензия от туморни клетки, туморните клетки се убиват и моноцитите се изолират от кръвта, индуцира се тяхното диференциране в дендритни клетки и така получените “незрели” дендритни клетки се инкубират с клетъчния лизат от убитите туморни клетки, индуцира се узряването на дендритните клетки и се добиват “зрелите” дендритни клетки.

Моноцитите предпочитано се изолират от левкоцитния слой, от отделени стволови клетки, от левкаферезни продукти или от цялостна кръв.

Диференциацията на моноцитите до “незрели” дендритни клетки предпочитано се индуцира чрез цитокини, IL-4 или GM-CSF. Особено удачни за индукция на узряването от “незрели” до “зрели” дендритни клетки са простагландин E_2 и TNF- α (туморно-некротичен фактор- α) и/или IL-1 β и IL-6 в допълнение към IL-4 и GM-CSF. Изготвянето на туморно-клетъчните суспензии най-общо се осъществява чрез изолиране и евентуално изследване на туморния материал, който след това се стрива и се превръща в пречистена клетъчна суспензия. В особено изпълнение на метода съгласно изобретението суспензията от туморни клетки се получава от автоложен туморен материал. В друго

предпочитано изпълнение експресията на мембранно-произлизащи протеинови комплекси се индуцира в туморно-клетъчната суспензия преди убиването на туморните клетки. Индукцията предпочитано се извършва чрез интерферон-гама и токоферол-ацетат. Убиването на туморните клетки се извършва, в частност, чрез замразяване. Събирането на зрелите дендритни клетки предпочитано се извършва, когато са налице типичните морфологични характеристики (например образуване на мрежа) при оценка чрез микроскопско изследване и/или чрез характеризиране на повърхностните антигени посредством флуоресцентни антители. Изобретението се отнася също до приложението на описания състав и неговите възможни изпълнения за получаване на лекарствени средства за лечение на тумори.

Съгласно изобретението, описаният състав и неговите възможни изпълнения се използват също за получаване на лекарствени средства за противотуморни ваксини.

Примери за изпълнение на изобретението

Изготвяне на състав за лечение на тумори

A) Получаване на лизат от туморни клетки

За получаване на туморна тъкан участъците с мастна, съединителна и функционална бъбречна тъкан, както и кръвоносните съдове и некротични тъкани, които са ясно забележими макроскопски, се отстраняват внимателно и се изхвърлят. Вече получената тъкан се стрива до възможно най-малък размер (парченца с диаметър 2-3 мм) и/или се енуклеира, като след това се прехвърля в стерилно сито (50-100 меш) заедно с обкръжаващата я среда. Тъканните парченца в

ситото се прекарват през него посредством стъклена пръчка при бавно разбъркване под налягане. Преминалите клетки се прехвърлят в стерилна мензура със среда RPMI 1640 и след добавяне на 15 мл среда RPMI (RPMI 1640 с 25 ммол HEPES) тъканните остатъци в него отново се прекарват през ситото чрез стъклената пръчка.

Клетъчната суспензия се наслаява върху 45% Percoll-ова възглавница. Този етап служи за отстраняване на всички налични еритроцити и за обогатяване на моноклеарните клетки върху Percoll-овата възглавница. Напълнените тръбички се центрофугират и междинната фаза с моноклеарните клетки се изсмуква, прехвърля се в тръбичка, пелетизира се чрез центрофугиране и се промива с разтвор на NaCl/глюкоза. Общият брой от живи клетки се определя микроскопски чрез Neubauer-ова броячна камера след оцветяване на клетките с трипаново синьо. В допълнение се извършва клетъчно типизиране чрез TestSimplets[®] (Boehringer Mannheim), който е подходящ за превръщане на карциномните клетки в различни от други клетки чрез процес на бързо оцветяване. След повторно суспендиране на клетките в разтвор на натриев хлорид/глюкоза, се добавят витамин Е (изготвя се в 700 µg/доза) и интерферон-гама (изготвя се в 1500 МЕ/доза). Сместа се инкубира на водна баня при 37°C за два часа, центрофугира се и се промива двукратно с разтвор на натриев хлорид/глюкоза. Сместа се прехвърля в криотръбички и се превръща в туморно-клетъчен лизат чрез замразяване при $-85^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Качествените контроли включват тестове съгласно спецификация за клетъчно броене, стерилност и девитализация.

В) Получаване на дендритните клетки и на състава за лечение на тумори

Използвани среди:

Среда А: RPMI среда + 1% автоложна плазма

Среда В: среда А + GM-CSF (800 Е/мл) + IL-4 (1000 Е/л)

Среда С: среда В + TNF- α (1000 Е/л) + простагландин E₂ (1 μ g/ml)

Левкоцитен слой от дарена кръв, от левкаферези или цялостна кръв от кръвно сакче се прехвърлят в центрофужни тръбички и се центрофугират. Междинната фаза съдържа мононуклеарните клетки (= левкоцитен слой) и се отделя от еритроцитите (на дъното) и плазмата (горния слой). Плазмата и мононуклеарните клетки се наслояват върху Lymphoprep[®] (Nycomed) и се центрофугират. След това плазмата и мононуклеарните клетки се отделят с пипета и отново се центрофугират. Остатъчната плазма се съхранява при +2°C до +8°C с цел да се изготви допълнителна среда А, ако е необходима. Клетъчната пелета се промива двукратно с разтвор на NaCl (0.9%) и се центрофугира. Преди втория етап на промиване живите клетки се изброяват след оцветяване с трипаново синьо. Утайката от центрофугирането се отделя в среда А при клетъчна концентрация 4×10^6 /мл. Клетъчната суспензия се слага в Петри-панички и се инкубира при 37°C $\pm$ 1°C и 5% CO₂ за два часа. След това се извършва микроскопската проверка за адхерентни клетки (моноцити), след което средата А се изсмуква внимателно, за да се отделят не-адхерентните клетки.

Среда В се добавя в Петри-паничките, последвано от инкубация при 37°C $\pm$ 1°C и 5% CO₂. В ден 1 среда В се изсмуква и се добавя прясна среда. В ден 2 среда В се изсмуква частично (3 мл) и се добавя прясна среда В (3 мл). В ден 5 се извършва микроскопска проверка, за да се види дали адхерентните клетки са претърпели преход в не-адхерентния етап. Клетките от една доза се комбинират и живите

клетки се изброяват след оцветяване с трипаново синьо. Клетките се центрофугират и се вземат в отброено количество (5×10^5 /ямка/3мл) в среда С - обемът, отговарящ на една десета от крайния обем; добавя се отброено количество от туморно-клетъчния лизат (5×10^4 /ямка/3мл), последвано от хомогенизиране и инкубация за 1 час при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 , след което среда С се допълва до крайния обем. Клетъчната суспензия се поставя в 6-ямкови плочки и се инкубира при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . В дни 6 и 7 се извършва микроскопска проверка; процесът на узряване на дендритните клетки започва да се демонстрира чрез "мрежообразуване". На ден 8 зрелите дендритни клетки се "добиват" след микроскопската проверка, при която "мрежообразуването" става изразено. Зрелите дендритни клетки се пелетизират чрез центрофугиране и двукратно промиване. Утайката от центрофугирането се слага в 0.9% NaCl-разтвор, изброяват се живите клетки след оцветяване с трипаново синьо, като се използва 0.9% NaCl-разтвор за нагласяване на желанния клетъчен брой.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Състав, който се получава чрез метод, при който туморният материал се изследва, стрива и превръща в пречистена клетъчна суспензия, която след това се инкубира с интерферон-гама и токоферол ацетат и се замразява до образуване на туморно-клетъчен лизат,

при който моноцитите се изолират от левкоцитен слой и цялостна кръв, като след това се индуцира диференцирането им в дендритни клетки чрез инкубация с цитокини, които преминават в не-адхерентен стадий,

след което изчислено количество от горепосочения замразен туморен лизат се размразява, добавя се като антиген, добавят се цитокини, извършва се инкубация и се добиват получените зрели дендритни клетки.

2. Състав съгласно претенция 1, за получаването на който се използва автоложен туморен материал.

3. Състав съгласно претенция 1, за получаването на който за диференцирането до "зрели" дендритни клетки се използват IL-4 и GM-CSF.

4. Лекарствено средство, съдържащо състав съгласно поне една от претенции 1 до 3.

5. Метод за получаване на лекарствено средство, при който се изготвя туморно-клетъчна суспензия, туморните клетки се убиват, изолират се

моноцити от кръв, индуцира се тяхното диференциране до дендритни клетки,

и така получените “незрели” дендритни клетки се инкубират с клетъчния лизат от убитите туморни клетки, индуцира се съзряването на дендритните клетки и се добиват “зрелите” дендритни клетки.

6. Метод съгласно претенция 5, при който моноцитите се изолират от левкоцитен слой, цялостна кръв, левкаферези или отделени стволови клетки.

7. Метод съгласно претенция 5 и/или 6, при който диференцирането на моноцитите до “незрели” дендритни клетки се извършва с цитокини, IL-4 и GM-CSF, със или без интерферон-гама.

8. Метод съгласно поне една от претенции 5 до 7, при който съзряването на “незрелите” дендритни клетки до “зрели” дендритни клетки се индуцира чрез простагландин E_2 и $TNF-\alpha$ и/или $IL-1\beta$ и $IL-6$ в допълнение към IL-4 и GM-CSF.

9. Метод съгласно поне една от претенции 5 до 8, при който туморно-клетъчната суспензия се изготвя чрез изолиране и евентуално изследване на туморен материал, който след това се стрива и превръща в пречистена клетъчна суспензия.

10. Метод съгласно поне една от претенции 5 до 9, при който туморно-клетъчната суспензия се изготвя чрез изолиране и евентуално изследване на автоложен туморен материал, който след това се стрива и превръща в пречистена клетъчна суспензия.

11.Метод съгласно поне една от претенции 5 до 10, при който експресията на мембранно-произлизащи протеинови комплекси се индуцира в туморно-клетъчната суспензия преди убиването на туморните клетки.

12.Метод съгласно претенция 11, при който експресията на мембранно-произлизащи протеинови комплекси се индуцира чрез интерферон-гама и токоферол ацетат.

13.Метод съгласно претенция 5, при който туморните клетки се убиват чрез замразяване.

14.Метод съгласно претенция 5, при който “зрелите” дендритни клетки се събират, когато са налице типични морфологични характеристики (например мрежообразуване), като се изследват чрез микроскопска проверка и/или чрез характеризиране на повърхностни антигени посредством флуоресцентни антитела.

15.Приложение на състав съгласно претенция 1 за получаване на лекарствено средство за лечение на тумори.

16.Приложение на състав съгласно претенция 1 за получаване на лекарствено средство за противотуморни ваксини.