



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 702**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95904529 .5**
86 Fecha de presentación : **22.12.1994**
87 Número de publicación de la solicitud: **0773789**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.1997**

54 Título: **Uso de xenoantígeno MHC en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **05.08.1994 IT MI94A1713**

73 Titular/es: **Applied Research Systems N.V.**
14 John B. Gorsiraweg
Curaçao, AN

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

72 Inventor/es: **Turiano, Angela**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Uso de xenoantígeno MHC en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de xenoantígenos, que son útiles para la estimulación del sistema inmune, particularmente para la terapia del cáncer, es decir, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el hombre y en mamíferos en general. Más específicamente, el uso de antígenos del complejo de histocompatibilidad principal (abreviadamente MHC por la expresión inglesa *major histocompatibility complex*) extraído de tejidos animales y con el mismo peso molecular (entre 10.000 y 50.000 daltons).

Fundamento de la técnica

En el tratamiento del cáncer, en vista de los resultados obtenidos hasta ahora con los fármacos sintéticos y las terapias físicas y químicas, los investigadores han buscado modos de desarrollar sistemas que estimulen la respuesta inmune del organismo contra la proliferación de células cancerosas. Se ha usado un factor denominado AF2 (alfa-fetoproteína), obtenido de extractos de embriones de corderos y ovejas en terapia de soporte antitumoral como un analgésico y antiemético biológico (*Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* **1990**, 79(16): 498-502). También se conoce un polipéptido antitumoral obtenido de células humanas similares a macrófagos de un peso molecular de 47.010 daltons. En la solicitud de patente italiana MI 93A001369 presentada a nombre del titular de la presente solicitud, se describe como los antígenos de histocompatibilidad y la ubiquitina o moléculas asociadas administrados a sujetos portadores de tumores estimulan una respuesta inmune mediada por células y/o humoral que pueden producir inhibición del crecimiento de las células tumorales y una regresión de la enfermedad neoplásica. Se sabe que los antígenos del MHC (que están presentes ubicuamente en las células) realizan una función de vital importancia para la regulación del sistema inmune tomando parte en el mecanismo que permite que las células inmunes diferencien antígenos extraños (no auto-antígenos) de los antígenos del individuo (auto-antígenos). Los antígenos y más en general las moléculas de histocompatibilidad están codificados por un grupo de genes localizados en una amplia región de un solo cromosoma.

Se reconocen tres clases principales de genes; *clase I*, que incluye genes que codifican los antígenos y moléculas responsables del rechazo de transplantes y destrucción de células autólogas alteradas; *clase II*, que incluye genes que codifican las estructuras superficiales que interfieren con la cooperación entre los linfocitos B y T y los macrófagos; y *clase III* que incluye genes que codifican algunas fracciones del "sistema del complemento" y la síntesis de una seroproteína (proteína Ss).

Los antígenos del MHC de la clase I están constituidos por dos cadenas polipeptídicas que no están unidas covalentemente. La cadena más larga, responsable de la alogenicidad, tiene un peso molecular de aproximadamente 43.000 daltons. La cadena más pequeña, identificada con la β -2 microglobulina, tiene un peso molecular de aproximadamente 13.000, no está codificada por el sistema del MHC, y es siempre la misma para cada clase de molécula de la clase I. Las dos cadenas polipeptídicas están covalentemente asociadas a una cadena inalterada de aproximadamente 33.000 daltons.

Los antígenos de MHC de la clase II se caracterizan por dos cadenas glicoproteínicas - una con un peso molecular de 34.000 daltons (denominada alfa), y la otra con un peso molecular de 29.000 daltons (denominada beta).

Los antígenos del MHC se aíslan usualmente después de que las células han sido destruidas por tratamiento con ultrasonidos, tratamiento con nitrógeno líquido, o congelación/descongelación. Una vez que se han preparado las membranas, se extraen las moléculas de histocompatibilidad mediante una variedad de detergentes o por proteolisis. También se usan sales de alta fuerza iónica para la extracción de los antígenos del MHC de células vitales, pero no de las membranas celulares. La cantidad más grande de los antígenos de histocompatibilidad se obtiene consistentemente con detergentes, tales como Nonidet P40 (véase por ejemplo, A. Dautigny *et al*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 298:783-789, 1973). En este caso es posible separar las diversas especificidades del MHC por electroforesis a un gradiente de pH.

El documento W09314126 describe un antígeno de clase II del complejo de histocompatibilidad principal para uso como vacuna contra el virus de la inmunodeficiencia en particular el virus de la inmunodeficiencia humana (en lo sucesivo VIH).

El documento W09401130 describe un antígeno de clase I del complejo de histocompatibilidad principal como vacuna contra un virus de la inmunodeficiencia en particular el VIH.

El documento EP 563627 describe un método de tratar cáncer usando la inmunoreacción específica para los antígenos tumorales expresados en la superficie de las células tumorales. En particular se administra como inmunoterapia un antígeno de clase I de histocompatibilidad no clásico.

El documento EP 569678 describe el uso de células tumorales en las cuales al menos se han insertado al menos dos genes codifican proteínas del MHC de diferentes haplotipos, y en donde al menos una de dichas proteínas del MHC tiene el mismo haplotipo que un haplotipo del individuo que ha de tratarse.

El documento EP 589678 describe también el uso de oligopéptidos derivados de la región hipervariable de la cadena beta de una molécula de la clase II del MHC para el tratamiento de respuestas inmunes perjudiciales, tales como autoinmunidad y alergias.

- 5 Labeta *et al.*, *J. Immunol Methods*. 1988;112(1):133-8, describen métodos de solubilización que usan diferentes detergentes, siendo la solubilización seguida por inmunoprecipitación y análisis por SDS-PAGE.

- 10 Dautigny *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. 1973. 298(4):783-9, describen un método de purificación de antígenos HL-A de plaquetas humanas. El método descrito consiste en una etapa de solubilización usando NP-40 como detergente seguido por una etapa de diálisis.

Sumario de la invención

- 15 Se ha encontrado que la respuesta inmune de un organismo afectado por neoplasma mejora considerablemente cuando se le administran antígenos de MHC extraídos de tejidos, suero o células de animales de diversa especie (xenoantígenos). Tal efecto es incluso más pronunciado y de larga duración si se alternan xenoantígenos de diferente origen.

Objetos de la invención

- 20 El objeto de la presente invención es por tanto el uso de xenoantígenos de MHC para la estimulación del sistema inmune, siendo dichas moléculas de MHC susceptibles de ser extraídas de tejidos, suero o células.

- 25 La expresión “*moléculas de histocompatibilidad*” en la presente memoria se refiere a antígenos del MHC y a todas las moléculas que están codificadas análogamente a los antígenos histocompatibles por los *loci* genéticos de MHC correspondientes, así como a sus moléculas asociadas obtenidas por extracción, y también se refiere a antígenos de glóbulos rojos.

- 30 La expresión “*moléculas de histocompatibilidad de diferente origen*” se refiere en la presente memoria a moléculas del MHC obtenidas de diferentes organismos o especies, o que se originan de diferentes lotes de tejidos, sueros o células.

- 35 Como se ha establecido antes, las moléculas de histocompatibilidad útiles para la invención se obtienen usualmente por extracción de tejidos animales, junto con sus moléculas asociadas. Los antígenos y moléculas de histocompatibilidad constituyen el verdadero ingrediente activo, mientras que sus moléculas asociadas se extraen junto con los antígenos y presumiblemente actúan como vehículos para las moléculas de histocompatibilidad.

- 40 Los antígenos y moléculas de histocompatibilidad usados para la presente invención se prepararon a partir de tejido de hígado de mamífero, usualmente hígado de ternera o cabra.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

- 45 Las Figuras 1 a 7 son gráficos que muestran la diferente proliferación de células tumorales en ratas tratadas y no tratadas.

Descripción de las realizaciones preferidas

- 50 Ejemplo I

Extracto con ácidos (HClO₄ 1N)

- 55 Se dispersó homogeneizado de hígado de ternera (5 g) en 10 ml de agua destilada, luego se añadieron gota a gota 10 ml de HClO₄ 2N en 20 minutos con agitación a 4°C. La agitación se continuó durante 30 minutos, y la mezcla se centrifugó a 100.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se dializó frente a agua del grifo y luego frente a agua destilada durante toda una noche. Se concentró en un factor de 5 con Amicon PM 10, y se añadió un volumen triple de KCl 4M en tampón de fosfato 0,05 M a pH 7,5. La mezcla se agitó a 4°C durante 24 horas y luego se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C. El líquido sobrenadante se dializó frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugó de nuevo. Finalmente, el extracto se concentró mediante ultrafiltración a través de una membrana con un corte de exclusión 10.000 daltons hasta una concentración de proteínas de 1 mg/ml.

Ejemplo II

- 65 *Extracción con detergentes (PBS + Nonidet P40)*

Hígado de ternera (103 g obtenido de un animal recientemente sacrificado) se cortó en pequeñas piezas y se homogeneizó en un mezclador Waring en 260 ml de PBS 0,14 M, pH 7,2, y 0,5% (v/v) de Nonidet P40. La homogenización

ES 2 285 702 T3

se hizo a 11.400 rpm durante 2 minutos (alternando 30 segundos de tratamiento con 30 segundos de reposo). Las valoraciones de proteínas en las diversas fases del tratamiento demostraron que la lisis celular era completa en 2 minutos. La muestra se agitó durante 45 minutos a 4°C y luego se centrifugó durante 90 minutos a 4°C en un rotor Sorvall SS-34 a 20.500 rpm (50.000 x g). El líquido sobrenadante (aproximadamente 300 ml) se sometió luego a diálisis a 4°C frente a 4 L de PBS 0,14 M, pH 7,2, con tres cambios en la fase de diálisis (un cambio cada 8 horas). Para la diálisis se usaron membranas con un corte de exclusión de 10 kDa.

La muestra así obtenida con un volumen de 310 ml, se sometió a una valoración de proteínas de acuerdo con el método de Lowry, usando seroalbúmina bovina como proteína de calibrado. Se obtuvo un título de $40,8 \pm 2,2$ mg de proteína/ml de solución. Una parte alícuota de la solución (150 ml) se diluyó hasta 1200 ml por adición de PBS 0,14 M a pH 7,2 y luego se congeló. La parte restante de la muestra se congeló tal como estaba.

Con los métodos de los ejemplos I y II se obtuvieron los antígenos del MHC y sus moléculas asociadas de un alto peso molecular (desde 10.000 a 50.000). El extracto de hígado así obtenido, denominado AIM-3, se usó para los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Para los ensayos *in vivo*, se usaron dos rutas de administración: subcutánea y local. La administración diaria a sujetos humanos de 4 ml de lapreparación obtenida con el ejemplo II da generalmente resultados positivos en aproximadamente 4 semanas. La neutralización de las proteínas del MHC por anticuerpos contra la mismas moléculas del MHC se evitó variando cada semana el origen del extracto, es decir, usando extractos de diferentes lotes obtenidos de la misma especie o de diferentes especies.

En cualquier caso, pueden usarse diferentes rutas de administración, tal como parenteral o por aerosol. La composición farmacéutica contendrá consecuentemente vehículos y sustancias inertes que son farmacéuticamente aceptables y elegidas de las conocidas en la técnica, en función de la vía de administración elegida.

La invención se describe a continuación con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos y las Figuras 1-7 pertinentes.

30 Experimentos *in vitro*

Ejemplo A

Se inocularon 4 células MOLT con el extracto del ejemplo 1. Las células inoculadas produjeron factor de necrosis tumoral (FNT) en el líquido sobrenadante solamente después de 24 horas después de la inoculación, con concentraciones claramente superiores a las encontradas en las células no tratadas (1000 pg/mL comparado con 300 pg/mL).

Experimentos *in vivo*

Se usaron ratas consanguíneas de Fischer que pesaban 150-175 g. El tumor se indujo por inoculación en la cavidad pleural de aproximadamente 250.000 células Yoshida AH-130. Dicha dosis permitió la observación del crecimiento del tumor durante 18 días antes de la muerte del animal.

Luego se administró tratamiento con la composición de la invención, tal como la obtenida en el ejemplo I, en dosis de 0,025 mg/kg/día en la pleura, peritoneo o subcutáneamente de acuerdo con los siguientes ejemplos.

Ejemplo B

Algunas de las ratas inoculadas se trataron con la dosis antes mencionada del extracto del Ejemplo I (pero obtenido de hígado de cabra) en la pleura (Δ), peritoneo (o) o subcutáneamente (Δ) desde el cuarto (4°) al octavo (8°) día y luego desde el día 12° al 16° de la inoculación celular (Fig. 1). Los datos (media $\pm$ error típico de 7 experimentos) mostraron que a partir del día 8° el número de células tumorales intrapleurales era significativamente menor en las ratas tratadas que en las ratas de control ($\bullet$) tratadas con una solución fisiológica.

55 Ejemplo C

En este caso, el extracto del ejemplo I se administró, en un tratamiento diario desde los días 4° a 15°. La Fig. 2 muestra la reducción en el crecimiento de las células tumorales en las células tratadas (o) con respecto a los controles ($\bullet$).

60 Ejemplo D

Se prepararon dos extractos de acuerdo con el ejemplo I de dos lotes diferentes de homogeneizado de hígado de ternera. El primer lote se administró para inocular las ratas desde el día 6° al día 14°, y el segundo lote se administró desde el día 15° hasta el día 21°. Los resultados mostraron que la tendencia de las células tumorales a proliferar disminuía cuando se variaban los extractos (Fig. 3). Los controles (curva superior) se trataron con una solución fisiológica como en los ejemplos previos.

Ejemplo E

En este experimento se administró desde el día 5° hasta el día 10°, un extracto obtenido como en el ejemplo I de hígado de cabra, y el mismo tipo de extracto pero obtenido de hígado de ternera se administró desde el día 11° hasta el día 16°. Los resultados mostraron una marcada reducción en el crecimiento celular a partir del día 8 en las ratas tratadas (○) con respecto a los controles (●) y también con respecto al crecimiento observado en las ratas tratadas de los ejemplos previos (Fig. 4).

Ejemplo F

En este caso se usaron ratas NIH-RNU⁺ (Fig. 5) y ratas NIH-RNU⁻ (es decir, sin timo) (Fig. 6), y se administró el extracto del ejemplo II. La Fig. 5 muestra el comportamiento de las ratas enteras tratadas (curva A) y de los controles correspondientes (curva B). La Fig. 6 muestra que el tratamiento con las moléculas de MHC del extracto obtenido de acuerdo con la invención no determinaba una reducción en la proliferación de las células tumorales hasta el día 8°, puesto que las ratas atímicas no tenían linfocitos T. A partir del día 9° en las ratas tratadas (curva C), hubo una reducción en el crecimiento de células neoplásicas causado por la activación de los linfocitos B específicos del tumor, y por la estimulación de otras células efectoras.

Aunque no se facilita en la presente memoria una explicación completa del mecanismo de la acción del ingrediente activo de la presente invención, se cree que está basado en la presencia de antígenos y moléculas del MHC que son altamente inmunógenos. La eficacia de dichas moléculas es el resultado de la activación, por las proteínas del MHC, de linfocitos anérgicos del sujeto portador del tumor. Las células tumorales normalmente evitan el ataque de los linfocitos T, puesto que estos, aunque hayan reconocido los antígenos tumorales, no reciben una segunda señal debido a que las células tumorales están exentas de moléculas co-estimulantes adecuadas. Las moléculas codificadas por un MHC extraño se unen a los receptores de los linfocitos T por un mecanismo análogo al que ocurre en el rechazo de trasplantes y ponen en marcha una serie de eventos bioquímicos que conducen a la destrucción de las células tumorales. En ratas exentas de linfocitos T, a las cuales se inocularon células tumorales, las proteínas del MHC completan la estimulación de los linfocitos B, que -aunque hayan reconocido el antígeno tumoral- en ausencia de los linfocitos coadyuvantes T permanecerían inactivas. Los resultados de los siguientes experimentos confirman dicha hipótesis.

Ejemplo G

Algunas de las ratas inoculadas se trataron con las dosis antes mencionadas del extracto del ejemplo II. Puesto que no se observó un crecimiento apreciable de células tumorales, se repitió el ensayo de acuerdo con el siguiente ejemplo.

Ejemplo H

Algunas de las ratas inoculadas se trataron con la dosis previamente citada empezando el día 5° en lugar el día 4°, administrando solamente un tipo de extracto. Los controles se trataron con solución salina fisiológica. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

También se investigó la posible acción del extracto del ejemplo II contra agentes virales, particularmente VIH. Se realizaron los siguientes experimentos *in vitro*.

Ejemplo III

Se evaluó el efecto de la sustancia añadida a cultivos de células linfoblásticas T contemporáneamente o a 4, 8 y 24 horas antes de la infección por VIH, en la replicación viral. Se añadió una parte alícuota (100 ng) de la sustancia a suspensiones de células (aproximadamente 800.000 células/ml de suspensión viral) de células MOLT 4 y células CEM. Las suspensiones de células se infectaron contemporáneamente y después de 4, 8 y 24 horas de preincubación a 37°C en CO₂ al 5% de la sustancia de examen con 100 μ l de suspensión viral que contenían 1 x 10⁴ DICT₅₀/mL de VIH. [DICT es la abreviatura de dosis infectiva en cultivo de tejidos. La DCIT50 es el nivel de dilución del virus en el cual la mitad de una serie de pocillos de laboratorio contienen virus activos en crecimiento].

La evaluación del efecto inhibitor se realizó comparando los niveles replicativos del VIH, medidos por determinación del antígeno viral P24 o actividad de transcriptasa inversa en el líquido sobrenadante de células pre-tratadas con respecto a células de control infectadas al mismo tiempo sólo con la suspensión viral. Las determinaciones de la replicación viral se realizaron los días 3, 6, 9, 12 y 15 desde la infección viral. Nuestros resultados muestran que la adición contemporánea de 100 ng de la sustancia y partículas virales a las suspensiones de células no determinaban inhibición de la replicación viral. Se observó una reducción en la replicación viral solamente después del pre-tratamiento de las células con la sustancia AIM 4 y 8 horas antes de la infección por VIH. Tal efecto inhibitor fue más evidente en las primeras fases replicativas del VIH, en los días 3° y 6° desde la infección, con valores de inhibición de 60-70%. El efecto inhibitor había disminuido cuando se analizó la replicación viral en los 9 días desde la infección y alcanzó valores de 30-20% en los días 12-15 desde la infección. En su lugar, no se observó efecto inhibitor cuando los cultivos celulares se pre-trataron durante 24 horas antes de la adición del virus.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del complejo de xenoantígenos del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos xenoantígenos del MHC se extraen de tejidos animales, suero o células.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dichos xenoantígenos del MHC tienen un peso molecular entre 10.000 y 50.000 daltons.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los xenoantígenos del MHC de diferentes especies han de ser administrados alternativamente.
- 15 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos xenoantígenos del MHC se obtienen en forma de un extracto de tejidos, células o sueros de animales mediante el uso de detergentes y tienen un pesomolecular de más de 10.000 daltons.
- 20 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los xenoantígenos del MHC son susceptibles de ser extraídos de hígado de cabra, ternera o cerdo o de glóbulos rojos de bovino.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

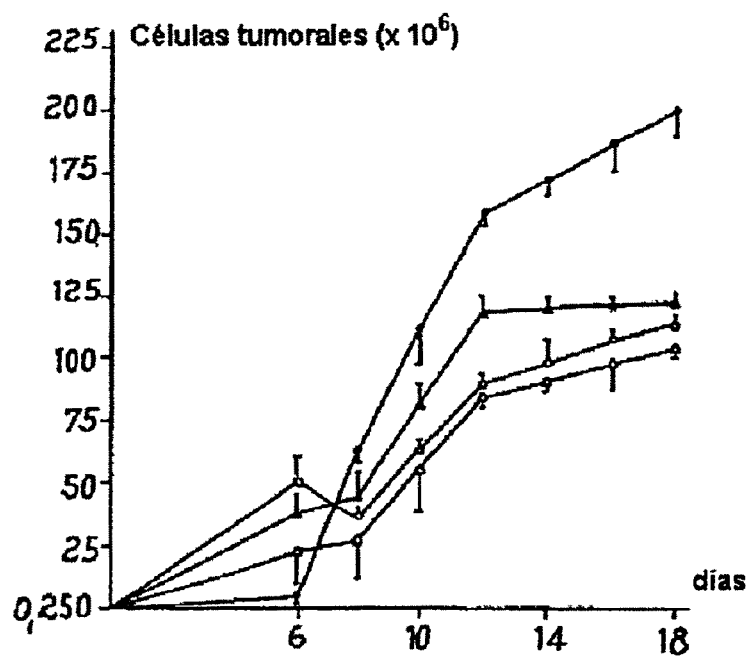


Fig. 1

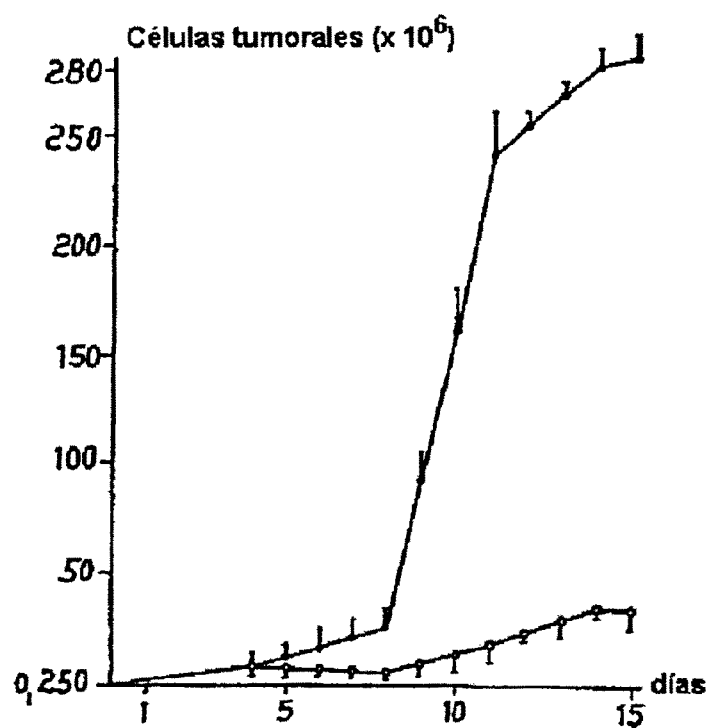


Fig. 2

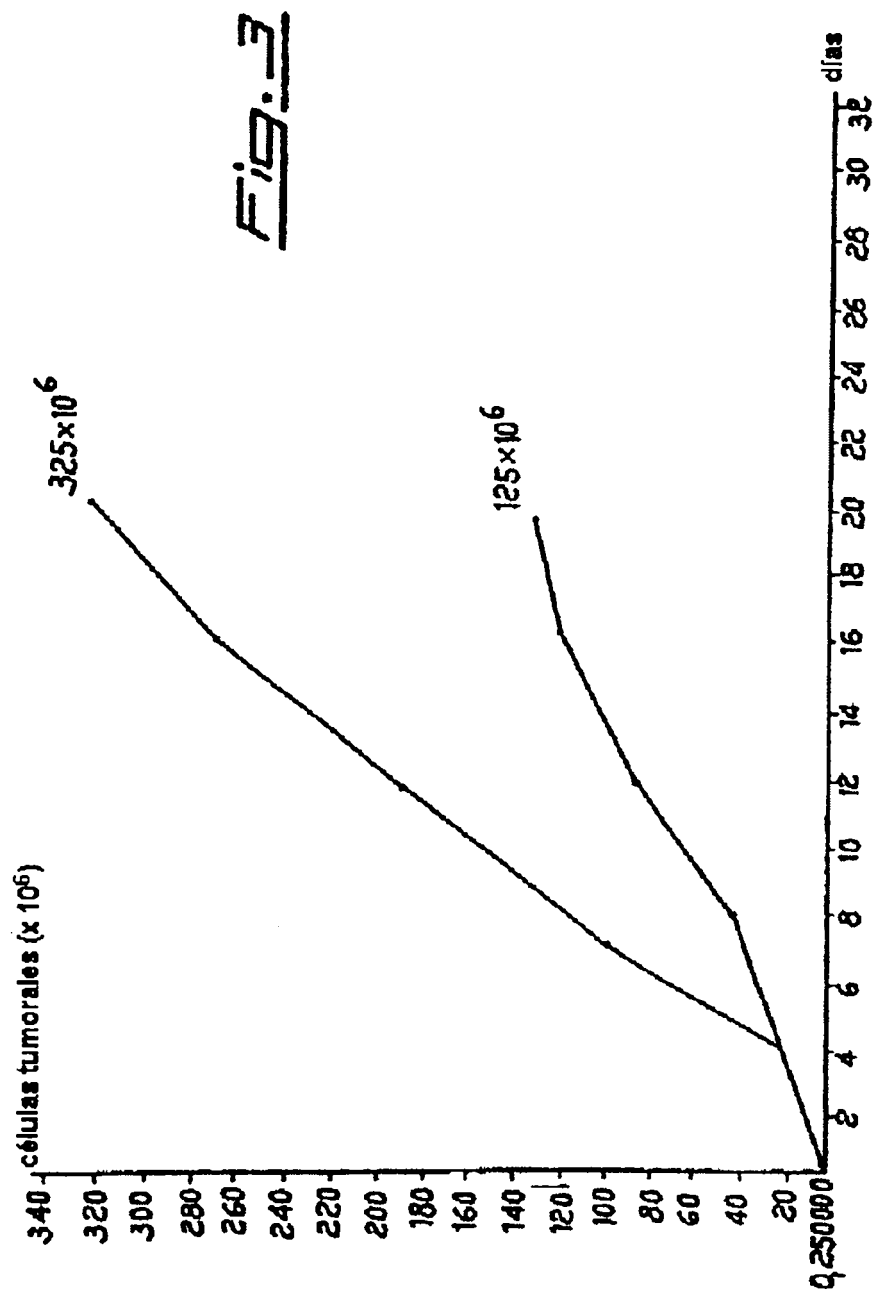


Fig. 4

