

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85 599

REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com
sede em D-3550 Marburg, Alemanha

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM AGENTE
TERAPEUTICO PARA TUMORES COMPREENDENDO
UM ANTICORPO MONOCLONAL OU UM SEU FRAG-
MENTO FC OU UM LIGANTE"

INVENTORES: Klaus Bosslet, Hans Ulrich Acharlemmer
e Hans Harald Sedlacek

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Alemanha, em 30 de Agosto de 1986, sob o No. P 36 29 640

~~CONFIDENTIAL~~

Memória descritiva referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores; Dr. Klaus Bosslet, Dr. Hans Ulrich Schorlemmer e Dr. Hans Harald Sedlacek, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM AGENTE TERAPÉUTICO PARA TUMORES COMPREENDENDO UM ANTICORPO MONOCLONAL OU UM SEU FRAGMENTO FC OU UM LIGANTE"

Memória descritiva

A presente invenção refere-se à utilização para a terapia de tumores de anticorpos monoclonais (MAK) ou de outros ligantes que possuam as propriedades de se ligarem a células do carcinoma do pâncreas e bloquearem pelo menos uma das funções celulares; pinocitose de ouro coloidal, produção de um anião super óxido ou a libertação de enzimas, especialmente de proteases neutras e muito particularmente de colagenase ou elastase, dos factores de crescimento, do factor de crescimento epidérmico, do factor de crescimento derivado de plaquetas, do factor estimulante de colónias, de eritropoetina, do factor de crescimento de fibroblasto, do factor de angiogenese de tumores ou do factor de transformação de crescimento.

Os processos apropriados para a preparação destes anticorpos monoclonais estão descritos na Especificação EP-A 0 160 897, na Especificação publicada Alemã 3 329 184 e no pedido de Patente Alemã 3 531 301 (depositado em 2.9.1985). Como ligantes entendem-se as moléculas que não são anticorpos monoclonais mas que se ligam igualmente a células do carcinoma do pâncreas e inibem as suas funções celulares, por exemplo determinadas hormonas.

Surpreendentemente, verificou-se que linhas de células do carcinoma do pâncreas humano segregam enzimas lisosómicos, podem promover a pinocitose de ouro coloidal e a produção do anião superóxido, e que estas funções celulares podem ser bloqueadas por uma ligação de anticorpos monoclonais, especialmente do 494/32, 495/36, 227/18 ou 227/19 às células do carcinoma do pâncreas. Os MAK 494/32 e 495/36 estão descritos no Pedido de Patente mencionado, enquanto que os restantes estão descritos na Especificação publicada mencionada. São ali caracterizados do seguinte modo: O 227/18 como AK 2 (quadro pág.8) e o 227/19 AK 16).

Uma consequência da reacção de adição destes MAK de que resulta o bloqueamento daquelas funções celulares, são regressões de carcinomas do pâncreas, de crescimento progressivo, em pacientes. Estas funções celulares das células do carcinoma do pâncreas incluem a libertação, especialmente de proteases neutras e muito particularmente de colagenase ou elastase, de factores de crescimento, do factor de crescimento epidérmico, do factor de crescimento derivado de plaquetas, do factor estimulante de colónias, de eritropoetina, do factor de crescimento do fibroblasto, do factor de angiogénese de tumores ou do factor de transformação de crescimento.

Os anticorpos monoclonais (MAK), que possuem as propriedades de se ligarem a células do carcinoma do pâncreas e bloquear funções fisiológicas, preferivelmente a pinocitose de ouro coloidal, a produção do anião superóxido ou a libertação de enzimas, especialmente de proteases neutras, muito particularmente de colagenase ou elastase, de factores do crescimento, do factor de crescimento epidérmico, do factor de crescimento derivado de plaquetas, do factor estimulante de colónias, de eritropoetina, do factor de crescimento de fibroblasto, do factor de angiogénese do tumor ou o factor de transformação de crescimento, são por conseguinte apropriados para a terapia de tumores cujas células possuem estas funções celulares. São igualmente apropriados fragmentos destes MAK que se liguem, excepto

o fragmento Fc, assim como outros ligantes, isto é, moléculas com a propriedade de se ligarem a células do carcinoma do pâncreas e que bloqueiam as funções referidas.

As células de tumores com as correspondentes propriedades secretóricas são por exemplo, além das do carcinoma do pâncreas, as do carcinoma da mama, carcinoma do ovário e adenocarcinoma do pulmão.

O objecto da invenção é por conseguinte a utilização para a terapia de tumores de um anticorpo monoclonal, ou de um seu fragmento não Fc, ou de um outro ligante, que tenha as propriedades de bloquear as seguintes funções celulares de uma célula de tumor: a pinocitose do outro coloidal, a produção do anião superóxido ou alibertação de enzimas, especialmente de proteases neutras, muito particularmente de colagenase ou elastase, de factores do crescimento, do factor de crescimento epidérmico, do factor de crescimento derivado de plaquetas, do factor de estimulação de colónias, eritropoetina, do factor de crescimento de fibroblasto, do factor de angiogénese de tumores ou do factor de crescimento de células do tumor do pâncreas.

Os tumores susceptíveis de terapia com estes MAK ou outros ligantes são por exemplo o carcinoma do pâncreas, o carcinoma da mama, o carcinoma do ovário ou adenocarcinomas do pulmão, especialmente o carcinoma do pâncreas.

Para comprovação se os MAK ou ligantes se ligam a células do carcinoma do pâncreas pode utilizar-se uma linha de células do carcinoma do pâncreas, por exemplo e preferivelmente a linha PANC-1 (Int. J. Cancer (1975) 15, 741; ATCC CRL 1469).

Para a escolha dos MAK ou ligantes utilizáveis no sentido da invenção determina-se a inibição da quimioluminescência de células de uma destas linhas de células pelo MAK ou ligantes. A determinação da quimioluminescência das cé-

lulas é um método de comprovar a produção do anião superóxido por uma célula e determinar a sua quantidade.

Com este objectivo a linha de células do tumor é cultivada em meio essencial mínimo "Dulbeccos's" ("Dulbeccos's minimal essential medium") ("DMEM") que contém 100 ml/litro de soro de vitelo fetal e 1 mole/litro de glutamina (DMEM-FKS-GLN). Para isso as células são tratadas no estado confluyente a 37°C durante 1 minuto com 2 g/litro de tripsina e 0,2 g/litro de EDTA em soro de Puck ("Puck's saline") e depois da lavagem são passadas na proporção 1:20 em DMEM-FKS-GLN. As células reunidas são deixadas aderir em DMEM durante 4 horas, com um índice de células de 10⁶ células num tubo de ensaio de fundo redondo de poliestireno. Depois de uma lavagem por 3 vezes em DMEM adicionam-se 100 µl de DMEM e a suspensão das células é colocada numa câmara de contagem de um Biolumaten (LB 95 05 Berthold Co., Wildbad, Alemanha). Ao conteúdo do tubo adicionam-se 50 µl de Luminol (100 µg/ml) e 100 µl de um estímulo (Stimulus) (50 µg/ml de zimosano ou 100 µg/ml de um imunocomplexo ou, para controle, 100 µl de PBS) e mede-se a emissão de luz (computador Apple II com a impressora MX-82 FIT Epson dot matrix printer). Para a determinação da inibição por um MAK adicionam-se 100 µl de uma solução do MAK e incuba-se durante 15 minutos (concentração final 10 µg/ml).

Os MAK 494/32, 495/36, 227/18, 431/31 assim como os outros descritos na DOS 3 329 184, 227/12 (AK 12) e 227/19 (AK 16), foram utilizados como exemplos neste ou nos seguintes sistemas de ensaio, tendo-se medido a sua ligação às correspondentes linhas de células de tumor no ensaio de imunofluorescência indirecta segundo Terasaki (Cancer detection and prevention (1983) 6, 881).

O quadro 1 a seguir mostra os resultados.

Quadro 1

MARK	Ensaio de ligação (Terasaki)	Inibição de Quimioluminescência		
		Estímulo		
		PBS	Zimosano	Imunocomplexo
		(Controle)		
227/12	negativo	0	7	3
431/31	negativo	0	8	0
494/32	positivo	6	59	37
227/18	positivo	21	54	66
227/19	positivo	17	42	48

Deste quadro pode deduzir-se que os MAK que não se ligam à membrana das células de tumores não inibem a quimioluminescência, enquanto que os que se ligam inibem.

Isto verifica-se igualmente com outros MAK que são apropriados como agentes terapêuticos antitumorais,

Para a comprovação da capacidade de um MAK inibir a pinocitose e a secreção enzimática procedeu-se do seguinte modo:

3×10^6 células de tumor obtidas da forma acima descrita e cultivadas em placas de Petri de 3,5 cm são incubadas durante 24 horas com os estímulos (zimosano ou um imunocomplexo ou PBS (controle) e eventualmente em conjunto com 10 µg de MAK/ml) e comprova-se a capacidade do MAK para inibição da libertação da enzima das células de forma correspondente às indicações das fontes da literatura (β -glucuronidase: J. Biol. Chem. (1946) 166, 757; β -galactosidase: Biochem. J. (1959) 71, 318; lactato-desidrogenase: Métodos de análise enzimática, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, República Federal Alemã, pag. 533 (1970); actividade pinocitótica: Biochem. Biophys. Res. Comm. (1973) 52, 627).

No quadro 2 mostra-se igualmente que os MAK

que se ligam a células PANC-1 também inibem a sua libertação de enzimas, enquanto que outras não provocam esta acção.

Quadro 2

MAK	Libertação de enzimas (% de inibição)		
	PBS	Zym	IC
494/32	21	42	34
495/36	26	86	90
227/18	2	52	52
227/19	0	54	51
431/31	4	7	3
227/12	5	0	0

No quadro 3 representa-se a capacidade de anticorpos monoclonais inibirem a actividade pinocitótica basal de células do tumor do pâncreas depois de ligação à membrana das células do tumor, As que não se ligam não inibem a pinocitose de ^{198}Au . Obtêm-se resultados idênticos aos da imunoglobulina intacta também com o fragmento $\text{F(ab}')_2$ do MAK 494/32.

Quadro 3

MAK	inibição da absorção de ^{198}Au (%)
494/32	42
495/36	53
227/18	61
227/19	60
431/31	5
227/12	4

Os MAK ou os seus fragmentos não Fc, ou outros ligantes, que estejam em condições de inibirem todas ou algumas das funções das células do carcinoma do pâncreas acima indicadas podem ser utilizadas para a terapia de tumores, especialmente do carcinoma do pâncreas.

Os dados clínicos mostram, depois da aplicação i.v. do MAK 494/32 (5 x a intervalos de um dia até 210 mg de dose total) que este MAK, depois de uma operação paleativa ao carcinoma do pâncreas progressivo, causou em 4 de 6 casos uma estabilização da doença (comprovada tomograficamente por computador) e uma melhoria subjectiva do estado geral dos pacientes.

Um medicamento apropriado para a terapia de tumores contém um MAK ou ligantes com as propriedades descritas na forma de uma solução, em forma liofilizada ou seca. Uma dose diária situa-se num intervalo de 20 a 500 mg por peso corporal de 70 kg. O agente é aplicado por via parentérica, de preferência por infusão. Uma quantidade eficaz é administrada ao paciente num intervalo de tempo desde 1 minuto até 3 horas. O agente é ministrado a intervalos de tempo de 1 dia até vários meses.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Processo para a preparação de um agente terapêutico para tumores caracterizado pelo facto de se incorporar numa gama que proporcione uma dose diária de 20 a 500 mg por peso corporal de 70 kg um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento não Fc ou um ligante, que tenha pelo menos uma das propriedades:

bloquear a pinocitose de ouro coloidal, a produção do anião superóxido ou a libertação de enzimas, especialmente de proteases neutras, muito particularmente de colagenase ou elastase, de factores do crescimento, do factor de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor) do factor de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor), do factor de estimulação de colónias (Colony Stimulating Factor), de eritro-

poetina, do factor de crescimento de fibroblasto (Fibroblast Growth Factor), do factor de angiogénese do tumor (Tumor Angiogenesis Factor) ou do factor de transformação de crescimento (Transforming Growth Factor) de células do tumor do pâncreas.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de se utilizar como anticorpo monoclonal o anticorpo BW 494/32.

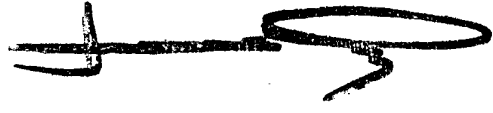
A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã em 30 de Agosto de 1986, sob o nº P 36 29 640.6.

Lisboa, 27 de Agosto de 1987

REPÚBLICA PORTUGUESA DA LINGUA E DO ALFABETO

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the left.

- 3 -



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM AGENTE TERAPEUTICO PARA TUMORES COMPREENDENDO UM ANTICORPO MONOCLONAL OU UM SEU FRAGMENTO Fc OU UM LIGANTE"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um agente terapeutico para tumores que compreende incorporar-se um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento Fc ou um ligante, que tenha pelo menos uma das propriedades: bloquear a pinocitose de ouro coloidal, a produção do anião superóxido ou a libertação de enzimas, especialmente de proteases neutras, muito particularmente de cloagenase ou elastase, de factores do crescimento, do factor do crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor) do factor de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor), do factor de estimulação de colónias (Colony Stimulating Factor), de eritropoetina, do factor de crescimento de fibroliasto (Fibroblast Growth Factor), do factor de angiogénese do tumor (Tumor Angiogenesis Factor) ou do factor de transformação de crescimento (Transforming Growth Factor) de células do tumor de pâncreas.