



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 538**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03019169 .6**

96 Fecha de presentación : **22.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1508338**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2005**

54 Título: **Antígenos de proteína útiles para la terapia del cáncer y la vacunación.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2009

73 Titular/es: **Axenoll AG.**
Tafernstrasse 2A
5405 Baden-Dättwil, CH

72 Inventor/es: **Singh, Mahavir;**
Böhle, Andreas;
Sänger, Christian y
Brandau, Sven

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Antígenos de proteína útiles para la terapia del cáncer y la vacunación.

- 5 La invención se refiere al uso de antígenos de proteína sumamente inmunogénicos para vacunación e inmunoterapia del cáncer en seres humanos y animales.

Antecedentes

- 10 La prevención y el tratamiento del cáncer todavía es un desafío para la ciencia. El carcinoma urotelial de la vejiga, por ejemplo, representa aproximadamente el 4% de todas las muertes por cáncer en los hombres. La gran mayoría de los tumores (70-80%) es superficial al diagnosticarse y, tras terapia quirúrgica local, presenta una alta tasa de recidiva local (70%) y evolución (30%). Por tanto, los pacientes necesitan exámenes de seguimiento médico de por vida con revisiones de sus vejigas y son necesarios tratamientos profilácticos eficaces para prevenir recidivas y la evolución del tumor. Ensayos clínicos han mostrado que la instilación de BCG (bacilo Calmette-Guerin) en la vejiga es superior con respecto a la quimioterapia tópica y la resección transuretral del tumor para prevenir recidivas y la evolución local especialmente en pacientes con tumores de alto riesgo (1,2). A pesar de varias ventajas claras de la inmunoterapia con BCG para el tratamiento del cáncer de vejiga, varios problemas y limitaciones comprometen su uso. Aunque el BCG es el agente más eficaz frente al carcinoma de células de transición (CCT) superficial, actualmente todavía hay de un 30 a un 40% de pacientes que no responden a la terapia con BCG (3). En el caso del cáncer de vejiga invasivo del músculo, el BCG no ha mostrado ser eficaz en absoluto (4). La actividad del BCG también parece estar estrictamente localizada. Como organismo vivo, el BCG presenta problemas de toxicidad únicos asociados con su uso. Aunque solamente el 5% de estos problemas son graves, la mayoría si no todos los pacientes experimentan algunos síntomas de vejiga irritable (quiste) durante la terapia con BCG (5). Aproximadamente el 40% desarrolla hematuria y el 30% experimenta síntomas pseudogripales incluyendo fiebre, malestar y náuseas o vómitos. Se ha notificado septicemia por BCG real en el 0,4%, incluyendo algunos casos que han sido mortales (6).

- Los efectos secundarios notificados ponen de relieve la necesidad de formas alternativas de tratamiento, tal como se desea generalmente para cualquier tipo de cáncer.

- 30 Se investigaron varios compuestos derivados del BCG como preparaciones de pared celular; arabinomananos o células fantasma de BCG completo para servir como sustitutos no viables para la terapia del cáncer de vejiga. Tkachuk et al. Urologiya; Nefrologiya, 1996, 2, 23 - 25 observaron que el BCG puede prevenir recidivas de cáncer de vejiga superficial sometido a resección transuretral en la mayoría de los pacientes. Pero ninguna de estas sustancias pudo usarse satisfactoriamente en estudios de terapia preclínicos.

- PstS1 es una proteína transportadora de fosfato ubicada en la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y BCG de *M. bovis*. Es una lipoproteína glicosilada que también se secreta en el sobrenadante de cultivo extracelular (7,8). Además, varios estudios han mostrado que PstS1 representa uno de los antígenos más inmunogénicos con aplicaciones potenciales en el diagnóstico y el desarrollo de vacunas para tuberculosis (9-20). Está implicada en la captación activa y el transporte de fosfato inorgánico a través de la membrana. Esta es una de las proteínas requeridas para el transporte de fosfato mediado por la proteína de unión en la tuberculosis. La secuencia de PstS1 se proporciona, por ejemplo, en el documento EP 519 218, su número de registro de Genbank es, por ejemplo, M30046. En el documento EP 926 156 se da a conocer el uso de vectores de expresión que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica para PstS1 para el tratamiento de neoplasia. Sin embargo, en ese documento se indica que la propia proteína no previene la formación de tumores. Esto está de acuerdo con el conocimiento común de que existe una manera diferente de procesamiento de antígenos endógenos y exógenos y su presentación. Por tanto, la administración exógena normalmente no provoca la misma respuesta inmunitaria que la expresión endógena, véase por ejemplo (21).

- 50 En vista de lo anterior, es un objeto de la invención hallar una composición para la profilaxis y para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y especialmente para el tratamiento del carcinoma urotelial de la vejiga.

Sumario de la invención

- 55 Los inventores encontraron un potencial antitumoral notable con PstS1 micobacteriana recombinante, especial pero no necesariamente, en el contexto de una inmunoestimulación inespecífica con partículas de DL-lactida (partícula L).

- La PstS1, similar a BCG, puede inducir la proliferación de linfocitos, la liberación de IFN- γ de CMSP y la citotoxicidad mediada por células frente a células de carcinoma de vejiga T24 de CMSP *in vitro*. Se han llevado a cabo 60 cinéticas de dosificación adicionales con PstS1 en los sistemas de lectura mencionados anteriormente. Estos hallazgos condujeron a experimentos de terapia *in vivo* en un modelo de cáncer de vejiga ortotópico murino, lo cual reveló que ratones preferiblemente vacunados previamente con partículas L y tratados con PstS1 por vía intravesical revelaron una razón de supervivencia significativa superior que los animales control.

- 65 Un aspecto de la invención es el uso de una proteína PstS1 micobacteriana de tipo natural o recombinante o una proteína homóloga o un equivalente sintético o una parte terapéuticamente eficaz de uno de estos tal como se define a continuación, para la preparación de una vacuna o una composición terapéutica para el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de PstS1 en combinación con partículas L.

Puesto que la invención proporciona una inmunoestimulación, según la presente invención, es posible un tratamiento y/o una vacunación para cualquier tipo de cáncer, por ejemplo cánceres de mama, pulmón, vejiga, melanoma u otros.

Descripción detallada de la invención

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “proteína PstS1” se define por la secuencia de aminoácidos completa que corresponde al número de registro de GeneBank M30046. Están incluidas en esta definición las variantes de las proteínas que muestran una homología de al menos el 60%, por ejemplo al menos el 70%, al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, por ejemplo al menos el 95% o al menos el 99% con los números de registro de GeneBank anteriores. Estas variantes de las proteínas anteriores pueden estar presentes en la naturaleza o pueden originarse a partir de fuentes no naturales. Las fuentes naturales pueden ser proteínas de diferentes especies, etc. Las fuentes no naturales pueden ser, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis al azar, la última de las cuales puede lograrse, por ejemplo, mediante productos químicos o mediante el uso de radiación ionizante. Las secuencias de aminoácidos pueden incluir sustituciones, deleciones, inserciones o combinaciones de estas alternancias. Las proteínas resultantes pueden ser biológicamente activas, biológicamente activas de manera parcial o biológicamente inactivas siempre que sean inmunológicamente eficaces.

La expresión “fragmentos de proteína” se refiere a todos los fragmentos de las proteínas correspondientes, es decir PstS1. Preferiblemente estos fragmentos tienen una longitud de al menos 8 aminoácidos. Estos fragmentos de proteína comparten una homología de al menos el 70%, preferiblemente el 80%, preferiblemente el 90%, por ejemplo el 95% o el 99% con respecto a las secuencias de aminoácidos naturales tal como se da a conocer en GeneBank. El porcentaje de homología se calcula basándose en la longitud del fragmento de proteína, no basándose en la longitud de la proteína. Por tanto, un fragmento de proteína con una longitud de secuencia de 20 aminoácidos que incluye 4 aminoácidos diferentes de la secuencia correspondiente de la proteína divulgada es un fragmento homólogo al 80% de la proteína divulgada.

Para determinar la homología entre secuencias de aminoácidos se conocen en la técnica diversos paquetes de software informático.

La proteína puede aislarse de fuentes naturales o puede prepararse mediante tecnologías recombinantes o mediante protocolos de síntesis química conocidos por el experto. Además la purificación de la misma puede realizarse mediante técnicas comúnmente conocidas.

La secuencia de aminoácidos puede modificarse químicamente o de manera postraducciona. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede consistir tanto en D-aminoácidos como en L-aminoácidos, y combinaciones de los mismos. Estas secuencias también pueden comprender aminoácidos modificados y/o inusuales. Además, al menos uno de los aminoácidos en la respectiva secuencia de aminoácidos puede modificarse de manera postraducciona, por ejemplo mediante modificaciones de fosfato o sulfato, glicosilación, amidación, desamidación, cadenas laterales de aminoácidos oxidados o amidados, etc. Estas sustancias también se conocen como equivalentes de las respectivas proteínas.

El término PstS1 tal como se usa en el presente documento abarca la propia proteína así como los fragmentos, los equivalentes y homólogos tal como se definieron anteriormente.

El término “vacunación” tal como se usa en el presente documento significa que el sujeto que va a vacunarse recibe una cantidad eficaz de la vacuna para provocar una respuesta inmunitaria con el fin de establecer una inmunización protectora.

La vacunación puede obtenerse administrando la vacuna por adelantado, lo que significa provocar una inmunización protectora, que a veces también se denomina vacunación preventiva. La vacunación también puede efectuarse como medida terapéutica. En particular, en vacunas para la terapia del cáncer se administran después o en combinación con otras medidas terapéuticas tras la identificación del tumor. Este tipo de vacunación también se conoce como vacunación terapéutica.

Además, en el caso en el que se usan dos tipos de compuestos diferentes como vacuna, estos compuestos pueden administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente. Además, puede administrarse un primer compuesto, lo que también se denomina vacunación previa. Después se administra el segundo compuesto. Por ejemplo, puede administrarse el segundo compuesto después de algunas horas o días más tarde, por ejemplo 1, 2, 3, etc., días más tarde.

La eficacia de las proteínas, equivalentes, fragmentos y homólogos de las mismas como vacuna o composición terapéutica se expresa por ejemplo en la tasa de supervivencia de los ratones tratados, tal como se ejemplifica a continuación. Lo que significa que una sustancia eficaz según la presente invención puede aumentar la tasa de supervivencia en comparación con un grupo control que no recibió la vacuna.

La proteína de antígeno PstS1 según esta invención es un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* de aproximadamente 38 kDa (Ag38) o una proteína homóloga de aproximadamente 33 a 38 kDa, cada uno de tipo natural o recombinante (7, 8, 12, 14). Con respecto al antígeno de 38 kDa conocido de *Mycobacterium tuberculosis* y los homólogos del mismo puede hacerse referencia, por ejemplo, al documento EP-A-92 108 254.1 y a las referencias citadas en ese documento. Dentro del alcance de esta invención se incluyen los equivalentes o fragmentos terapéuticamente eficaces de los mismos y de la proteína Hsp16. Un "fragmento terapéuticamente eficaz" es un fragmento de la respectiva proteína que es, similar a PstS1, eficaz en una preparación para una vacuna o una composición terapéutica para el tratamiento del cáncer tal como se da a conocer en esta invención.

Una realización preferida es el uso para la preparación de una vacuna o una composición terapéutica para el tratamiento de un carcinoma urotelial de la vejiga o un carcinoma de mama.

La vacuna o la composición terapéutica según la invención también puede contener adyuvantes, vehículos farmacéuticamente aceptables, aditivos, fármacos y/o componentes farmacéuticos adicionales. El médico experto hará uso de estas opciones en el caso de que le parezca apropiado.

Además es posible que la vacuna o la preparación o un kit de preparaciones contenga partículas de DL-lactida (partículas L) y/o células dendríticas, preferiblemente derivadas de los monocitos sanguíneos.

Preferiblemente cada proteína está presente en una concentración de desde 0,1 hasta 100 µg/ml.

La invención también incluye un método de tratamiento de un individuo que padece carcinoma, que comprende la etapa de administrar al menos una vez una proteína PstS1 micobacteriana de tipo natural o recombinante o una proteína homóloga o un equivalente o un fragmento terapéuticamente eficaz de uno de estos y/o una proteína Hsp 16 de tipo natural o recombinante o una proteína homóloga o un equivalente o un fragmento terapéuticamente eficaz de uno de estos al respectivo individuo.

Antes de la administración de PstS1, el método comprende preferiblemente una vacunación previa de dicho individuo con un inmunoestimulante inespecífico, que preferiblemente puede ser una composición que comprende partículas de DL-lactida (partículas L) también incluyendo la posibilidad de vacunar previamente con partículas de DL-lactida solas. De nuevo, se usan preferiblemente las proteínas en concentraciones que oscilan desde 0,1 hasta 100 µg/ml. Alternativamente, el inmunoestimulante inespecífico, puede administrarse simultáneamente con la(s) proteína(s) según la presente invención. El calendario para la vacunación puede depender de la clase de terapia o profilaxis. Es decir, la vacunación puede ser una vacunación preventiva o terapéutica.

Cuando el carcinoma es un carcinoma urotelial de la vejiga, la administración puede ser al menos por vía intravesical en la vejiga. Otras vías están dentro del alcance de la invención. Explícitamente, es posible una administración sistémica, puesto que ambos antígenos no son tóxicos, cuando se aplica en dosificaciones moderadas. Por supuesto, la vía de administración también depende del tipo de cáncer que va a tratarse. El médico en el campo puede elegir las formas galénicas y las vías adecuadas.

Por ejemplo, en el caso de carcinoma urotelial de la vejiga, puede administrarse la proteína (PstS1) sola con o sin vacunación previa con, por ejemplo, partículas L.

En el caso de otras vías de administración, puede realizarse una vacunación previa con partículas L antes de administrar PstS1, o, alternativamente, se administra una composición de partículas L y la(s) proteína(s).

Un régimen apropiado puede proporcionar tratamientos repetidos, en el que las etapas del método tal como se citaron anteriormente se repiten al menos una vez dentro de un periodo de 1 - 28 días.

La invención se describirá ahora en detalle con referencia a las figuras y los ejemplos a continuación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra que PstS1 puede estimular CMSP *in vitro*;

la figura 2 muestra que la estimulación de PstS1 en CMSP es dependiente de la dosis;

la figura 3 muestra la supervivencia prolongada de ratones C57/BL6 estimulados con partículas L tras la terapia con PstS1 intravesical;

la figura 4 muestra la supervivencia prolongada de ratones C57/BL6 estimulados con partículas L tras la terapia con PstS1 intravesical.

Métodos

Activación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Cultivo celular

- Se cultivó la línea celular de tumor de vejiga humano T-24 a 37°C y 5% de CO₂ en RPMI 1640 que contenía FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Se cultivó la línea celular de tumor de vejiga murino MB-49 en DMEM que contenía FCS al 10%, L-glutamina al 1%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

Generación de células BAK y CMSP activadas por PstS1

- Se obtuvieron CMN de sangre heparinizada de donantes humanos sanos mediante la centrifugación con disolución de separación Biocoll (Biochrom, Berlín/Alemania) y se ajustaron hasta una concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI-1640 (PAA Laboratories, Linz/Austria) que contenía el 5% de suero humano, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Se añadió PstS1 recombinante (38 kDa, soluble, Lionex GmbH, Braunschweig) o Hsp16 (16 kDa, soluble, Lionex GmbH, Braunschweig) en concentraciones de desde 0,1 µg/ml - 100 µg/ml, BCG (subcepa Connaught, Immucyst, 4×10^4 ufc/ml) o PBS (100 µl) y se cultivaron las células durante 7 días en placas de microtitulación de 6 pocillos a 37°C y 5% de CO₂.

Ensayo de liberación de cromo

- Se determinó la citotoxicidad en un ensayo de liberación de cromo de 4 horas convencional. Se marcaron las células diana con Na₂⁵¹CrO₄ durante 1 h a 37°C, se lavaron y se resuspendieron a 5×10^4 células/ml. Se añadieron células efectoras hasta un total de 100 µl de células diana a una razón efectora:diana de 40:1. Se determinó el contenido radiactivo del sobrenadante en un contador gamma (Berthold, Wildbad/Alemania). Se determinó la lisis específica según la fórmula: lisis esp. (%) = $100 \times (\text{Exp} - \text{Spo}) / (\text{Max} - \text{Spo})$ en la que Exp es la liberación experimental, Spo la liberación espontánea y Max la liberación máxima. Se realizaron todos los ensayos por triplicado con diferentes donantes.

Detección de IFN-γ

- Se recogieron los sobrenadantes de CMSP estimuladas con PstS1, BCG y PBS en el día 7 y se examinaron para determinar la presencia de IFN-γ. Se llevó a cabo cada experimento varias veces con diferentes donantes. Se realizó la detección con un kit de ELISA de Bioscience (San Diego, EE.UU.).

Ensayo de proliferación

- Se estimularon CMSP durante 7 días con PstS1, BCG o PBS. Se cultivaron 2×10^4 /pocillo de las CMSP estimuladas en una microplaca de pocillos junto con 1 µCi de ³H-timidina (cinco pocillos por muestra). Se recogió el ADN sobre membranas filtrantes y se midió la incorporación la timidina mediante recuento por centelleo líquido (contador: placa beta LKB Wallace 1205).

Preparación de partículas L

Se diluyeron partículas L (10 mg/ml) (Lionex GmbH) 4:1 con PBS y se ajustó el pH hasta 7,0 con NaOH.

- Vacunación con partículas L e inmunoterapia en ratones C57BL/6*

- Se adquirieron ratones C57BL/6 hembras con de 6 a 8 semanas de edad de Charles-River Laboratories. Para someter a prueba la eficacia de la terapia con PstS1 en los ratones C57/BL6 se usó un modelo de cáncer de vejiga ortotópico singénico divulgado (10). Se vacunó por vía subcutánea a los ratones (ensayo I: 15 animales por grupo; ensayo II: 11 animales por grupo) con 250 µg de partículas L o 100 µl de PBS. Diez días más tarde se anestesió a los ratones mediante tratamiento intraperitoneal con pentobarbital (0,067 mg/g). Tras la inserción de un catéter intravenoso de teflón de calibre 24 (Insyte-W, Becton Dickinson, Alemania) por vía transuretral en la vejiga, se realizó electrocoagulación con un hilo guía. Después de eso, se instilaron por vía intravesical 6×10^4 células MB-49 en la vejiga. Se realizó inmunoterapia intravesical con 100 µg de PstS1 en 100 µl de PBS en los días 1, 8, 15 y 22 tras la implantación del tumor. Se instilaron los grupos control con PBS (100 µl) solo. Se controló diariamente el estado de viabilidad de los ratones. Se sacrificaron los ratones supervivientes en el día 70. Se comparó la supervivencia de los ratones usando el análisis de Kaplan-Meier y la prueba de rangos logarítmicos.

Ensayo de proliferación de esplenocitos

- Se sacrificaron los ratones supervivientes del segundo experimento de terapia en el día 120 tras la instilación del tumor. Se separaron por lavado con RPMI los esplenocitos de tres ratones por grupo. Tras el lavado de las células restantes con PBS, se lisaron los eritrocitos con H₂O. Después, se cultivaron 2×10^4 esplenocitos por pocillo en una microplaca de pocillos junto con PstS1 10 µg/ml durante un periodo de 2 días (cinco pocillos por muestra). Entonces se añadió 1 µCi de ³H-timidina y se incubaron las células durante 15 h a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente se recogió el ADN sobre membranas filtrantes y se midió la incorporación de timidina mediante recuento por centelleo líquido (contador: placa beta LKB Wallace 1205).

ELISA de α -PstS1 de sangre periférica murina

120 días tras la implantación del tumor se recogió la sangre periférica de todos los ratones y se centrifugó a 2000 rpm en una minicentrífuga. Se usó el suero para la determinación de anticuerpos IgG frente a PstS1 usando un kit desarrollado por Lionex GmbH.

Ejemplos

Para investigar la respuesta inmunitaria frente a PstS1 y Hsp16, se llevó a cabo un ensayo de reestimulación de esplenocitos y se determinó la presencia de anticuerpos anti-PstS1 o anti-Hsp16 en la sangre periférica de los ratones.

La PstS1 puede estimular CMSP *in vitro*. Para determinar la capacidad de PstS1 de estimular CMSP, se incubaron las células con PstS1 10 μ g/ml. Se eligió la producción IFN- γ , la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad frente a células de tumor de vejiga T24 como sistema de lectura. Los resultados muestran claramente, que en comparación con el control negativo, PstS1 puede estimular la producción de IFN- γ , inducir la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad de CMSP (figura 1). Se muestran los resultados para PstS1. Mientras que la citotoxicidad y la proliferación mediadas por PstS1 fueron comparables con los efectos mediados por BCG, PstS1 fue menos potente que BCG en la inducción de IFN- γ de CMSP. No obstante, en todos los donantes sometidos a prueba se secretaron cantidades sustanciales de IFN- γ (de 1 ng a 14 ng/ml) tras la estimulación con PstS1. Tal como se esperaba, la magnitud de la capacidad inmuoestimuladora fue variable entre los diferentes donantes. Sin embargo, la PstS1 indujo de manera reproducible la producción de IFN- γ , la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad en comparación con controles no estimulados.

La figura 1 muestra que PstS1 puede estimular CMSP *in vitro*. Se estimularon CMSP durante 7 días con PstS1 (10 μ g/ml), BCG (4 X 10⁴ ufc/ml) o PBS (100 μ l). A ensayo de liberación de cromo de 4 horas frente a células de tumor de vejiga T-24 con razones de célula efectora-diana de 40:1, 20:1 y 10:1 B se determinó la liberación de IFN- γ mediante ELISA de sobrenadantes de las CMSP estimuladas C se midió la proliferación de células T mediante un ensayo de incorporación de ³H-timidina durante la noche (1 μ Ci/2 x 10⁴ células).

La estimulación con PstS1 en CMSP es dependiente de la dosis

Se midieron la citotoxicidad, la proliferación de linfocitos y la liberación de IFN- γ de CMSP estimuladas durante 7 días con dosis de PstS1 de 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml y 100 μ g/ml. En los tres sistemas de lectura, una dosis de 10 μ g/ml fue óptima para la respectiva inmuoestimulación (figura 2). La estimulación con PstS1 en CMSP mostró una curva dosis-respuesta óptima típica con un pico a aproximadamente 10 μ g/ml.

La figura 2 muestra que la estimulación con PstS1 de CMSP es dependiente de la dosis. Se estimularon CMSP durante 7 días con diferentes concentraciones de PstS1 en un intervalo de desde 0,1 μ g/ml hasta 100 μ g/ml. A: ensayo de liberación de cromo de 4 horas frente a células de tumor de vejiga T-24. Razón de célula efectora-diana de 40:1. B: se determinó la liberación de IFN- γ mediante ELISA a partir de sobrenadantes de las CMSP estimuladas. C: se midió la proliferación de células T mediante un ensayo de incorporación de ³H-timidina durante la noche (1 μ Ci/2 x 10⁴ células).

Inmunoterapia intravesical con PstS1 tras estimulación previa con partículas L

Para determinar el potencial terapéutico de PstS1, se monitorizó la supervivencia de ratones C57/BL6 que portaban tumor vacunados previamente con partículas L, que se trataron por vía intravesical cuatro veces en intervalos semanales con PstS1. Los ratones vacunados previamente con PBS y tratados sirvieron como control de toma tumoral (grupo control). En el experimento terapéutico representado en la figura 3A pudo mostrarse que, a diferencia del grupo control, los ratones vacunados previamente con partículas L, tratados con PstS1 revelaron una supervivencia prolongada significativamente (p = 0,0148). En contraposición, los ratones vacunados previamente con partículas L pero tratados con PBS no mostraron una supervivencia prolongada significativamente en comparación con el grupo control (p = 0,2759).

La figura 3 muestra la supervivencia prolongada de los ratones C57/BL6 estimulados con partículas L tras la terapia con PstS1 intravesical. Ensayo-1, A: ratones C57/BL6 que portaban tumor, vacunados previamente con partículas L tras cuatro instilaciones semanales de PstS1 (P = 0,0148). Vacunación previa con partículas L/terapia con PstS1 = gráfico negro; Vacunación previa con PBS/ terapia con PBS = gráfico gris. B: ratones C57/BL6 que portaban tumor vacunados con partículas L pero instilados cuatro veces con PBS (P = 0,2759). Vacunación previa con partículas L/ terapia con PBS = gráfico negro; vacunación previa con PBS/ terapia con PBS = gráfico gris. Se calculó la significación con un análisis de Kaplan Meier y una prueba de rangos logarítmicos. C: 100 días tras la implantación del tumor, se estudió la respuesta humoral en ratones midiendo los anticuerpos IgG específicos generados mediante el tratamiento con PstS1.

Inmunoterapia intravesical con PstS1 tras estimulación previa con partículas L (2. Ensayo)

En un segundo ensayo, se vacunó previamente a los ratones con PBS y partículas L, respectivamente, y se inocularon después por vía intravesical. Ambas estrategias condujeron a un número mayor significativamente de ratones supervivientes (chi-cuadrado) confirmando adicionalmente el potencial terapéutico de PstS1 intravesical.

La figura 4 muestra la supervivencia prolongada de los ratones C57/BL6 estimulados con partículas L tras la terapia con PstS1 intravesical. Ensayo II A, ratones C57/BL6 que portaban tumor, vacunados previamente con partículas L tras cuatro instilaciones semanales de PstS1 ($P = 0,0394$). Vacunación previa con partículas L/ terapia con PstS1 = gráfico negro; vacunación previa con PBS/ terapia con PBS = gráfico gris. B, ratones C57/BL6 que portaban tumor vacunados con PBS e instilados cuatro veces con PstS1 ($P = 0,1052$). C, 120 días tras la implantación del tumor, se analizaron los sueros de los ratones mediante ELISA para detectar anticuerpos específicos frente a PstS1. D, 120 días tras la implantación del tumor, se reestimularon los esplenocitos aislados de los ratones supervivientes (tres animales por grupo, un animal del grupo control) con PstS1 ($10 \mu\text{g/ml}$) durante dos días y se analizó la proliferación mediante la incorporación ^3H -timidina. En comparación con ratones control con PBS/PBS y partículas L/partículas L, los esplenocitos de los grupos con PBS/PstS1, partículas L/PstS1 y L-BSA/PstS1 mostraron un aumento de la tasa de proliferación. Columnas negras = estimulación de nuevo de control con PBS. Columnas grises = reestimulación con PstS1. En el caso de los grupos con partículas L/PstS1 y L-BSA/PstS1, uno de los tres animales no mostró aumento de la proliferación de esplenocitos. Estos datos no se muestran en el diagrama.

15 Proliferación de esplenocitos

El hecho de que, tras dos días de incubación con PstS1, pudo observarse la proliferación de esplenocitos de los ratones tratados con PstS1, es un fuerte indicio de la presencia de células T de memoria específicas para PstS1 (figura 4D).

20 Respuesta humoral

También se estudió la respuesta serológica frente al tratamiento con PstS1 en ratones. Todos los ratones tratados con PstS1 mostraron anticuerpos IgG en el suero frente a PstS1. Ninguno de los ratones del grupo control mostró ningún anticuerpo frente a PstS1 (figura 4C).

Ambos resultados muestran la interacción entre PstS1 administrado por vía intravesical y componentes del sistema inmunitario del huésped.

30 Conclusiones

Tomados en conjunto, estos hallazgos muestran que en el modelo de ratón ortotópico y en el contexto de la vacunación previa con partículas L, la PstS1 muestra un efecto terapéutico distinto que conduce a una supervivencia a largo plazo de ratones, mientras que la inmunización con partículas L sola no es suficiente para una terapia satisfactoria. El tratamiento con PstS1 sin estimulación previa con partículas L da como resultado un número superior considerable animales supervivientes y demuestra que este antígeno micobacteriano solo también muestra un potencial antitumoral considerable.

Referencias citadas

1) Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, Stanisic TH, Smith JA Jr, Sullivan J, Sarosdy MF, *et al.*, *N Engl J Med.* 24 de octubre de 1991; 325(17):1205-9.

2) Herr HW, Schwalb DM, Zhang ZF, Sogani PC, Fair WR, Whitmore WF Jr, Oettgen HF. *J Clin Oncol.* junio de 1995; 13(6):1404-8.

3) Herr HW, Badalament RA, Amato DA, Laudone VP, Fair WR, Whitmore WF Jr., *J Urol.* enero de 1989; 141(1):22-9.

4) Cymes M *et al.*, *J Urol* 147, 273A, 1992

5) Lamm DL., *Urol Clin North Am.* agosto de 1992; 19(3): 573-80. Revisión. 6) Steg A *et al.*, *Eur Urol*, 21, 35, 1992

6) Lamm D.L., *et al.*, EORTC Genito-Urinary Group Monograph 6 : BCG in superficial bladder cancer, Debruyne, F M J, Denis, L, v.d. Meijden A P M, págs. 335-355, *Liss*, Nueva York, 1989

7) Espitia C, Mancilla R., *Clin Exp Immunol.* septiembre de 1989; 77(3):378-83.

8) Young DB, Garbe TR., *Res Microbiol.* enero de 1991; 142(1):55-65.

9) Ivanyi J *et al.*, *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control* (Ed. Bloom, B). *ASM Press*, Washington, 1994, págs. 437

10) Gunther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Bohle A., *Cancer Res.* 15 de junio de 1999; 59(12):2834-7.

ES 2 320 538 T3

- 11) **Harris D P, Vordermeier H-M, Singh M, Moreno C, Jurcevic, S. e Ivanyi J (1995).** *Eur. J. Immunol.* 25, 3173-3179
- 12) **Wilkinson R J, Haslov K, Rappuoli R, Giovannoni F, Narayanan P N, Desai C R, Vordermeier M, Pausen J, Pasvol G, Ivanyi J y Singh M (1997).** *J. Clin. Microbiol.* 35, 553-557.
- 13) **Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj H, Hill M, Singh M, Ivanyi J y Vordermeier M (1997).** *J. Immunol.* 158, 5921-5926.
- 14) **Da Fonseca D P A J, Joosten D, Van der Zee R, Jue D I, Singh M, Vordermeier H M, Snippe H y Verheul A F M (1998)** *Infect. Immun.* 66, 3190-3197.
- 15) **Tanghe A, Lefèvre, P, Denis O, D'Souza S, Braibant M, Lozes E, Singh M, Montgomery D, Content J y Huygen K (1999)** *J. Immunol.* 162, 1113-1119.
- 16) **Venkataprasad N, Coombes, A G A, Singh M, Rohde M, Wilkinson K, Hudecz F, Davies S S y Vordermeier H M (1999)** *Vaccine* 17, 1814-1819
- 17) **Wilkinson K A, Katoch K, Sengupta U, Singh M, Sarin K K, Ivanyi J y Wilkinson R J (1999)** *J. Infect. Dis.* 179, 1034-1037.
- 18) **Dieli F, Friscia G, Di Sano C, Ivanyi J, Singh M, Spallek R, Sireci G, Titone I, y Salerno A (1999)** *J. Inf. Dis.* 180, 225-228.
- 19) **Da Fonseca DP, Frerichs J, Singh M, Snippe H, Verheul AF** *Vaccine*. 15 de agosto de 2000; 19(1):122-31.39:
- 20) **Imaz MS, Comini MA, Zerbini E, Sequeira MD, Spoletti MJ, Etchart AA, Pagano HJ, Bonifasich E, Diaz N, Claus JD, Singh M** *Int J Tuberc Lung Dis.* noviembre de 2001; 5(11):1036-43.
- 21) **Beltz GT, Carbone FR, Heath WR, Crit Rev Immunol, 2002, 22 (5-6), 439-448.**

REIVINDICACIONES

1. Uso de una proteína PStS1 micobacteriana de tipo natural o recombinante en la preparación de una vacuna o una composición terapéutica para el tratamiento del cáncer.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer que va a tratarse es un carcinoma urotelial de la vejiga, un carcinoma de mama o cáncer de pulmón.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la vacuna o la composición terapéutica contiene adyuvantes, vehículos farmacéuticamente aceptables, aditivos, fármacos y/o componentes farmacéuticos adicionales.

4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la vacuna contiene además un inmunoestimulante inespecífico en una composición individual o por separado.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que la vacuna contiene partículas de DL-lactida como inmunoestimulante inespecífico.

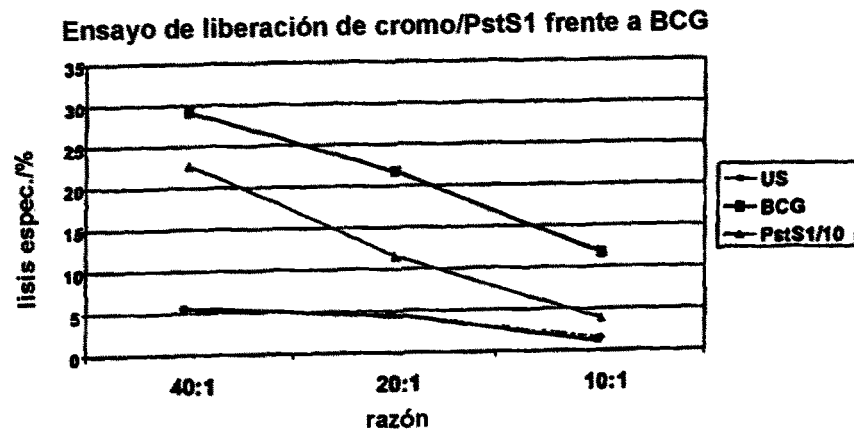
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha proteína está presente a una concentración de desde 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta 100 $\mu\text{g/ml}$.

7. Uso según la reivindicación 4 ó 5, en el que la vacunación previa es con dicho inmunoestimulante inespecífico seguido por al menos una vez el uso de una proteína PStS1 micobacteriana de tipo natural o recombinante.

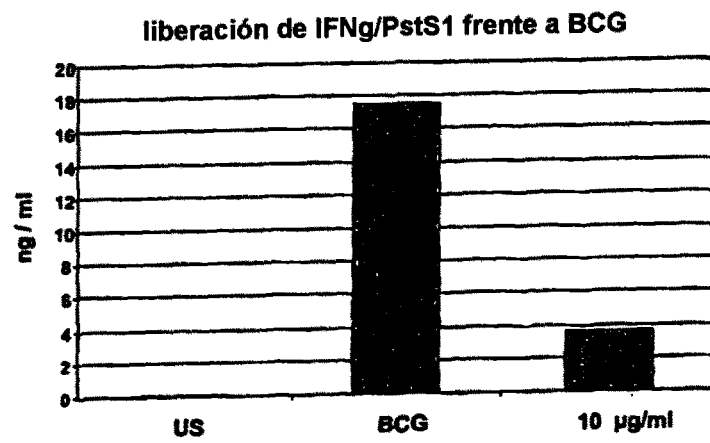
8. Uso según la reivindicación 2, para el tratamiento de carcinoma urotelial de la vejiga en el que la composición terapéutica está adaptada para administrarse por vía intravesical en la vejiga.

9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición terapéutica está adaptada para administrarse al menos dos veces dentro de un periodo de 1 a 28 días.

A



B



C

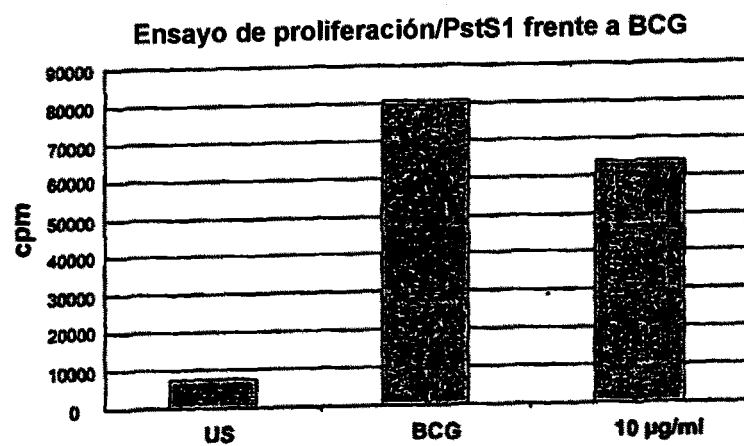
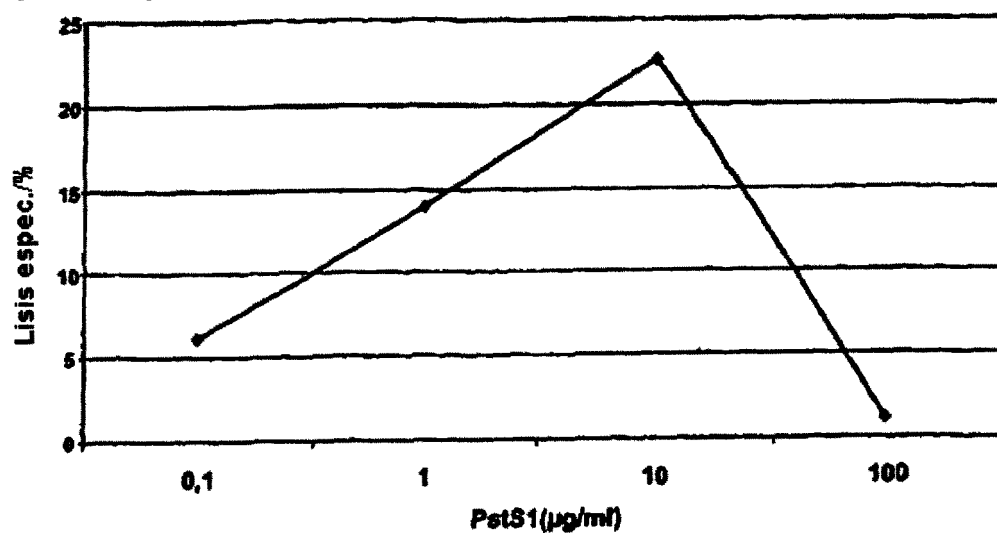
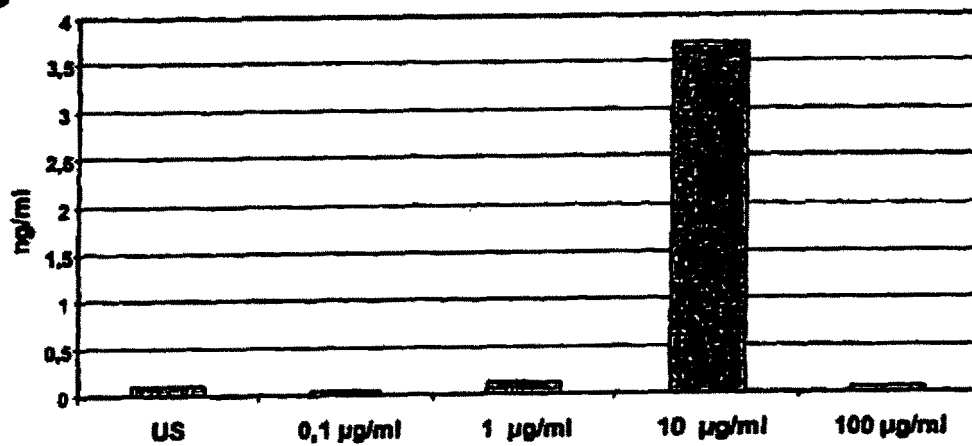


Fig. 1

A Ensayo de liberación de crono/Efecto de la dosificación (0,1-100 μ g/ml)



B Liberación de IFN γ /Efecto de la dosificación (0,1-100 μ g/ml)



C Proliferación/Efecto de la dosificación (0,1-100 μ g/ml)

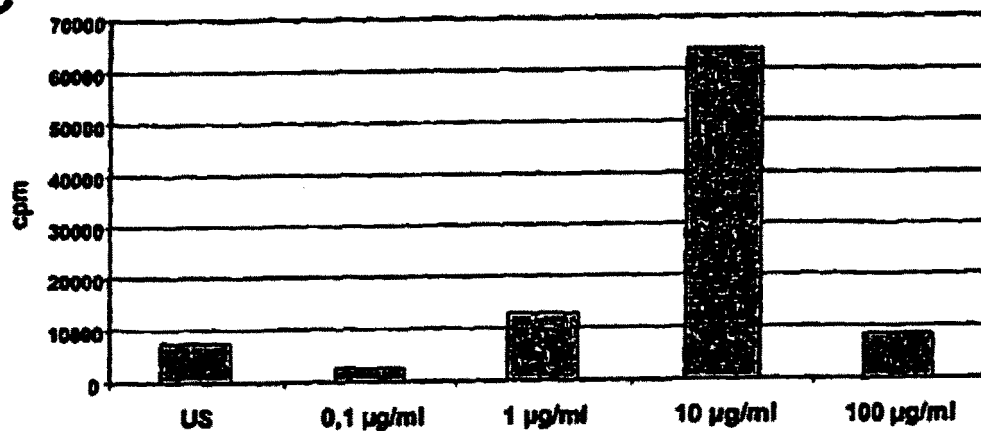


Fig. 2

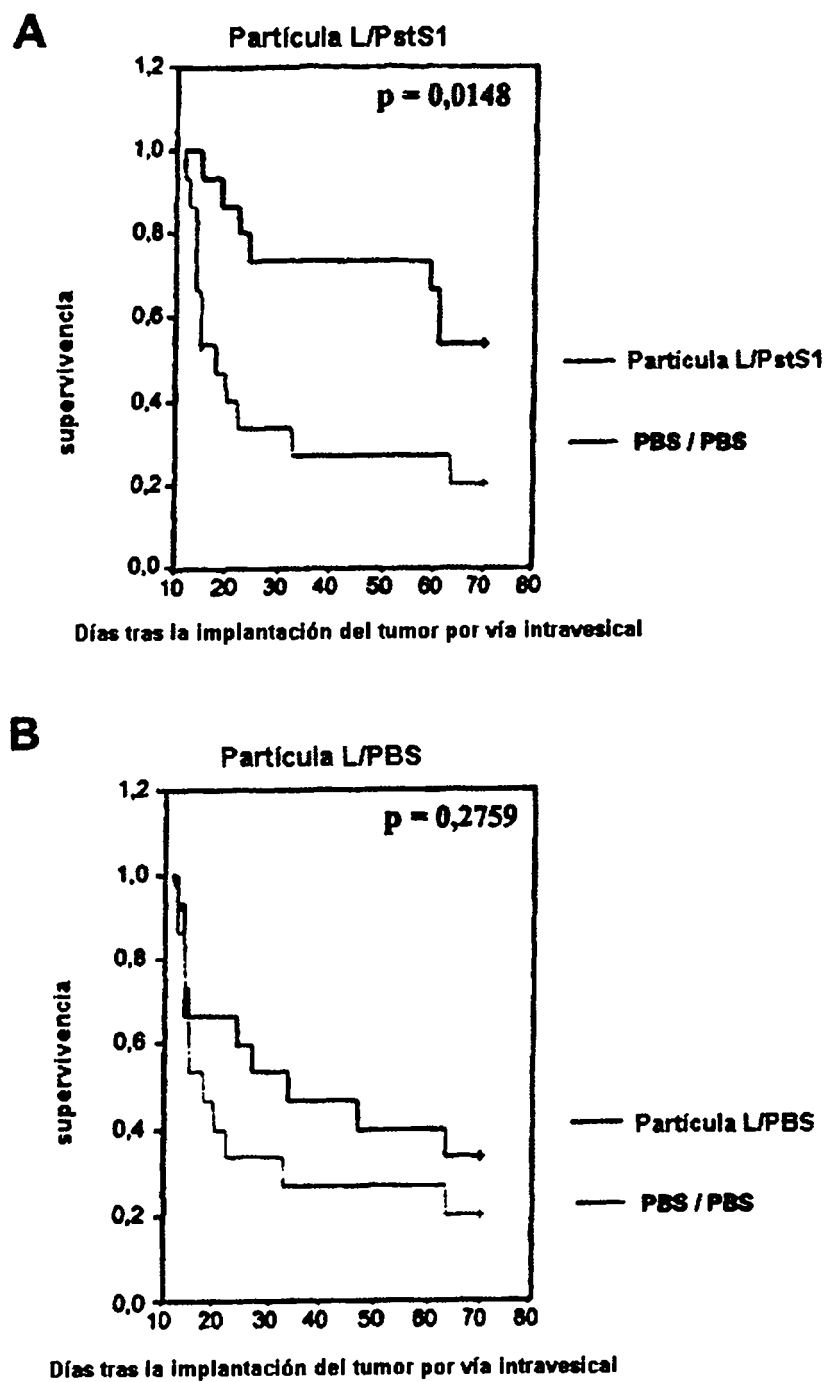


Fig. 3

Vacunación/Terapia	Resultado (anticuerpos específicos frente a PstS1)
PBS / PBS	neg
PBS / PBS	neg
PBS / PBS	neg
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PstS1	pos
Partícula L/PBS	neg
Partícula L/PBS	neg
Partícula L/PBS	neg

Fig. 3c

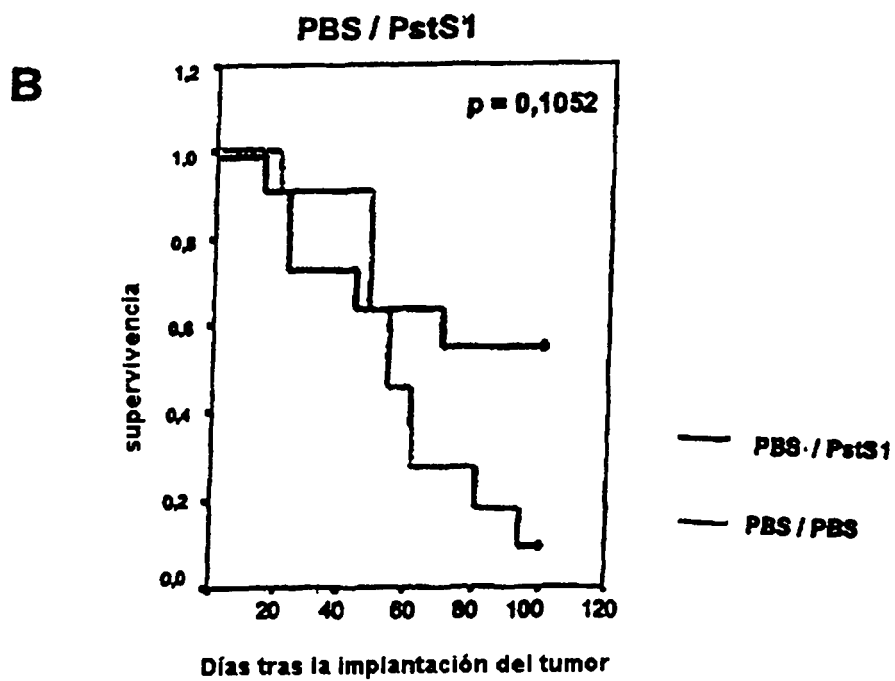
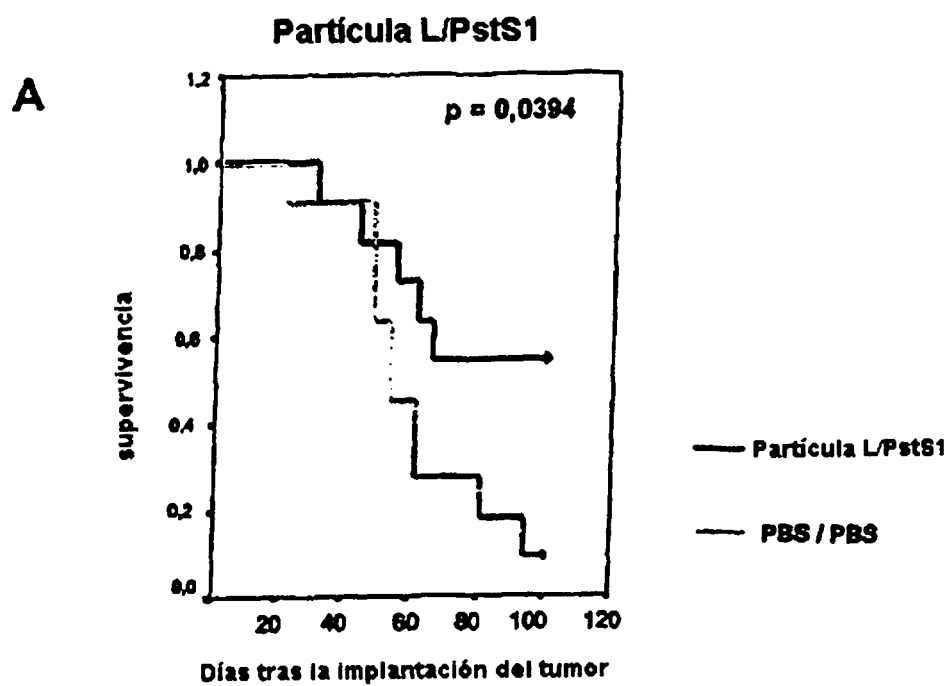


Fig. 4

Vacunación/Terapia	Resultado (anticuerpos específicos frente a PstS1)
PBS / PBS	negativo
PBS / PstS1	positivo
PBS / PstS1	positivo
PBS / PstS1	positivo
PBS / PstS1	positivo
PBS / PstS1	positivo
PBS / PstS1	positivo
Partícula L/PstS1	positivo
Partícula L/PstS1	positivo
Partícula L/PstS1	positivo
Partícula L/PstS1	positivo

Fig. 4c