



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 800**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01958002 .6**

86 Fecha de presentación : **21.07.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1305041**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **Medicamento para inmunoterapia de tumores malignos.**

30 Prioridad: **28.07.2000 EP 00116362**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **LipoNova AG.**
Feodor-Lynen-Str. 23
30625 Hannover, DE

72 Inventor/es: **Ulbrich, Claudia;**
Rockensüss, Klaus-Dieter y
Grossmann, Armin

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Medicamento para inmunoterapia de tumores malignos.

5 Son objeto de las presentes solicitudes composiciones que son especialmente adecuadas para inmunoterapia de tumores malignos, así como procedimientos para su preparación y el uso de las composiciones para la preparación de medicamentos.

10 Habitualmente, el tratamiento terapéutico de tumores se lleva a cabo mediante cirugía radical, quimio-, radio- u hormonoterapia. Estas terapias tienen numerosos efectos secundarios indeseados y conllevan considerables perjuicios para el paciente. Además, en algunos tumores no se consiguen casi mejoras con estas terapias, así que su aplicación no parece tener sentido en vista de los efectos secundarios. Entre ellos se cuentan especialmente tumores malignos, melanomas malignos, carcinomas renales, carcinomas intestinales y carcinomas pancreáticos. Por eso, los carcinomas renales poseen, por ejemplo, una tasa de mortalidad del 85%.

15 En los últimos años, se han reforzado los conocimientos sobre la compleja interacción entre tumores y sistema inmune. A este respecto, se han situado en el foco de interés estrategias para el tratamiento de tumores en las que se estimula el sistema inmune. En general, el fin de dichas terapias es conseguir que el sistema inmune reconozca antígenos específicos de células tumorales que no están presentes en células sanas o lo están en menores cantidades. Esto se consigue, por ejemplo, mediante la administración de un medicamento como se describe en *Anticancer Research* [(1997) n° 17, páginas 2879-2882 y 3117-3120]: a este respecto, se extrae tejido tumoral de un paciente y se procesa hasta un lisado de células tumorales autólogas, que se inyecta al paciente. Esto se hizo con la expectativa de que se formara inmunidad en el lisado contra los antígenos tumorales. Se describe otra estrategia en la solicitud de patente publicada WOA99/47687. Allí se da a conocer que se inyectan en pacientes que presentan antígenos autólogos células que expresan en su superficie un determinante tumoral especial.

20 El fin de las terapias tumorales no es sólo reducir el crecimiento de tumores y la formación de metástasis, sino también potenciar su regresión. Debe aumentar la esperanza de vida del paciente y mejorar su salud y calidad de vida. Sobre el éxito de las terapias inmunes, puede verificarse hasta el momento presente que los tratamientos terapéuticos hasta ahora pueden conseguir desgraciadamente sólo éxitos individuales o éxitos parciales. Un problema básico es que muchos marcadores tumorales están presentes en estados de diferenciación conocidos y en cantidades conocidas también en células sanas. Por tanto, a menudo se lleva a cabo la activación del sistema inmune contra dichos marcadores tumorales no en la medida deseada o con la especificidad necesaria.

25 Era objetivo de la presente invención desarrollar medicamentos para terapia tumoral que alcanzaran los fines anteriormente citados en gran medida. Las terapias tumorales deben ser realizables mediante el uso del medicamento según la invención también de forma relativamente rápida y sencilla.

30 La presente invención se refiere a una composición para la inmunoterapia de tumores. La composición es obtenible mediante un procedimiento en el que se valora el material tumoral, se tritura y se transfiere a una suspensión celular purificada que se incuba con interferón gamma y acetato de tocoferol y se congela, con lo que se forma un lisado de células tumorales y en el que se aíslan monocitos a partir de capas leucocitarias o de sangre completa, que a continuación se activan mediante incubación con citocinas para la diferenciación de células dendríticas y se transfieren al estado no adherente, después de lo cual se descongela una cantidad calculada del lisado de células tumorales congeladas anteriores, se añade como antígeno, se añaden citocinas, se incuba y se recogen las células dendríticas maduras formadas.

35 Por valoración del material tumoral se entiende la evaluación macroscópica del tejido, después de identificar las partes claramente reconocibles de tejidos grasos, conjuntivos y renales funcionales, vasos sanguíneos, así como otros tejidos no tumorales, y a continuación separar y desechar.

40 En una forma de realización especial, se usa en la producción de la composición material tumoral autólogo. En la producción de la composición, se añaden para diferenciación a células dendríticas inmaduras preferiblemente IL-4 y GM-CSF y/o IFN-gamma.

45 La composición según la invención es especialmente adecuada como medicamento o para la preparación de un medicamento para inmunoterapia. Los medicamentos que contienen el lisado celular según la invención se inyectan preferiblemente por vía intracutánea o subcutánea.

50 Con el medicamento según la invención, pueden tratarse todos los tipos concebibles de enfermedades tumorales sólidas. Son especialmente adecuados los medicamentos que contienen la composición según la invención para el tratamiento de tumores en los que otros procedimientos de tratamiento son poco exitosos. Estos son especialmente, además de otros tumores sólidos malignos, melanomas malignos, carcinomas renales, carcinomas intestinales, carcinomas pancreáticos, linfomas, carcinomas bronquiales y tumores ginecológicos.

55 En el tratamiento de pacientes con el medicamento según la invención en el marco de una terapia tumoral, se han verificado efectos positivos marcados inesperados para los pacientes. Pudo reducirse el crecimiento de tumores y la formación de metástasis en una medida sorprendente, mientras que se potenció la regresión de los tumores.

La salud, la calidad de vida y la esperanza de vida de los pacientes aumentaron claramente. Probablemente, estos efectos pueden conseguirse porque el medicamento según la invención se diferencia en aspectos esenciales de los conocidos. Es una diferencia especial de muchos procedimientos conocidos que no se administran sencillamente al paciente marcadores tumorales, sino que se infiltran estos en células dendríticas como vehículo directamente en el sistema inmune del paciente. Sorprendentemente, basta proporcionar a las células dendríticas *in vitro* un lisado celular bruto de células tumorales, mientras que según el documento WOA99/47687, se mezclan o se transfectan las células presentadoras de antígeno con un antígeno purificado. El procedimiento según la invención es por tanto también más rápida y más sencillamente realizable que los procedimientos conocidos. Esto es especialmente importante en la preparación de dichas sustancias terapéuticas, ya que el peligro de contaminaciones se mantiene bajo. Además, el lisado celular tiene la ventaja de que el repertorio antigénico total está disponible en una célula tumoral.

La presente invención se refiere también a procedimientos para la preparación de un medicamento en los que se prepara una suspensión de células tumorales, se destruyen las células tumorales y en los que se aíslan monocitos a partir de la sangre, se induce su diferenciación a células dendríticas y se incuban las células dendríticas "inmaduras" así obtenidas con el lisado celular de células tumorales destruidas, se induce la maduración de las células dendríticas y se recogen las células dendríticas "maduras".

Los monocitos se aíslan preferiblemente a partir de capas leucocitarias, de separación de células madre, de productos de leucaféresis o de sangre entera. La diferenciación de los monocitos a células dendríticas "inmaduras" se induce preferiblemente mediante las citocinas IL-4 y GM-CSF. Para la inducción de la maduración de células dendríticas "inmaduras" a "maduras" son especialmente adecuadas la prostaglandina E2 y TNF- α y/o IL-1 β e IL-6, además de IL-4 y GM-CSF. La preparación de la suspensión de células tumorales se lleva a cabo en general mediante el aislamiento de material tumoral, que se valora dado el caso, se tritura y se transfiere a una suspensión celular purificada. En una forma de realización especial del procedimiento según la invención, se prepara la suspensión de células tumorales a partir de material tumoral autólogo. En otra forma de realización preferida, se induce en la suspensión de células tumorales, antes de la destrucción de las células tumorales, la expresión de complejos proteicos de membrana. La inducción se lleva a cabo preferiblemente mediante interferón gamma y acetato de tocoferol. La destrucción de las células tumorales se lleva a cabo especialmente mediante congelación. La recogida de las células dendríticas maduras se lleva a cabo preferiblemente por la presentación de rasgos morfológicos típicos (por ejemplo, formación de velo), evaluados mediante control microscópico y/o mediante caracterización de los antígenos de superficie mediante anticuerpos fluorescentes. Es también parte de la invención el uso de la composición descrita y sus posibles formas de realización para la preparación de medicamentos para terapia tumoral.

La composición descrita y sus posibles formas de realización se usan según la invención también para la preparación de medicamentos para vacunas tumorales.

Ejemplo de realización

40 Preparación de una composición para terapia tumoral

A) Preparación de un lisado de células tumorales

Para la preparación del tejido tumoral, se separan cuidadosamente partes claramente reconocibles macroscópicamente de tejidos no tumorales como tejidos grasos, conectivos y renales funcionales, así como vasos sanguíneos y tejidos necróticos, y se desechan. El tejido preparado terminado se fragmenta lo más pequeño posible (trozos de aproximadamente 2-3 mm de diámetro) y/o se enuclea, y a continuación se transfiere con el medio circundante a un tamiz estéril (50-100 de malla). Se pasan todos los trozos de tejido que se encuentran en el tamiz con una varilla de vidrio con agitación lenta sin presión. Se transfieren las células traspasadas con el medio (RPMI 1604) a un vaso de precipitados estéril y se pasa el resto de tejido por el tamiz de nuevo con adición de 15 ml de medio RPMI (RPMI 1640 con 25 mmol de HEPES) con la varilla de vidrio.

Se recubre la suspensión celular con tampón Percoll al 45%. Esta etapa sirve para la separación de eritrocitos presentes dado el caso y para el enriquecimiento de células mononucleares en el tampón Percoll. Se centrifugan los tubos de ensayo llenados y se separa por filtración con succión la interfase con las células mononucleares, se transfieren a un tubo de ensayo, se separan por centrifugación y se lavan con disolución de NaCl/glucosa. Se determina el número total de células viables microscópicamente con ayuda de una cámara de recuento Neubauer después de tinción de las células con azul de tripano. Además, se lleva a cabo una tipificación celular con Testsimplerts[®] (Boehringer Mannheim), que es adecuada para hacer distinguibles células de carcinoma de otras células en un procedimiento de tinción rápido. Después de la resuspensión de las células en disolución de cloruro de sodio/glucosa, se añaden vitamina E (700 μ g/dosis que se ha de preparar) e interferón gamma (1.500 I.E./dosis que se ha de preparar). La preparación se incubaba en baño de agua durante 2 horas a 37°C, se centrifuga y se lava dos veces con disolución cloruro de sodio/glucosa. Se toman alícuotas de la preparación en tubos de ensayo criogénicos y se transfieren a un lisado de células tumorales mediante congelación a -85°C a $\pm$ 5°C. Los controles de calidad abarcan los ensayos según la memoria descriptiva de número de células, esterilidad y desvitalización.

ES 2 267 800 T3

B) Preparación de células dendríticas y de la composición para terapia tumoral

Medios usados:

Medio A: medio RPMI + plasma autólogo al 1%

Medio B: medio A + GM-CSF (800 U/ml) + IL-4 (1.000 U/ml)

Medio C: medio B + TNF- α (1.000 U/ml) + prostaglandina E₂ (1 μ g/ml)

Se transfieren las células mononucleares en cultivo a partir de muestras de sangre aptas de donantes desinteresados, de leucaféresis o sangre entera a tubos de ensayo de centrifugación y se centrifugan. La interfase contiene las células mononucleares (=capas leucocitarias) y se separa de los eritrocitos (inferior) y el plasma (superior). El plasma y las células mononucleares se recubren sobre Lymphoprep® (Nycomed) y se centrifugan. A continuación, se separan por pipeteo plasma y células mononucleares y se centrifugan de nuevo. Se retira el plasma y se usa para la preparación de los medios. Se mantiene el plasma restante a +2°C a +8°C para preparar medio A adicional dado el caso. Se lava el sedimento celular con disolución de NaCl (al 0,9%) dos veces y se centrifuga. Antes de la segunda etapa de lavado, se cuentan las células viables después de tinción con azul de tripano. Se incorpora el residuo de centrifugación a una concentración celular de 4×10^6 /ml al medio A. Se aplica la suspensión celular sobre placas Petri y se incuba durante 2 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/5\%$ de CO₂. Se lleva a cabo un control microscópico de las células adherentes (monocitos), después de lo cual se separa cuidadosamente por filtración con succión el medio A para separar las células no adherentes.

Se añade a las placas Petri medio B y se incuba a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/5\%$ de CO₂. El día 1, se separa por succión el medio B y se añade medio fresco. El día 2, se separa parcialmente con succión el medio B (3 ml) y se añade medio B fresco (3 ml). El día 5, se lleva a cabo un control microscópico de si las células adherentes han pasado al estado no adherente. Se combinan las células de una preparación y se cuentan las células viables mediante tinción con azul de tripano. Se separan por centrifugación las células y se incorporan en una cantidad calculada (5×10^5 /pocillo/3 ml) a medio C, correspondiendo el volumen a un décimo del volumen final, con una cantidad calculada de lisado de células tumorales (5×10^4 /pocillo/3 ml), se homogeneiza y se incuba durante 1 hora a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/5\%$ de CO₂, después de lo cual se completa al volumen final con medio C. Se siembra la suspensión celular en placas de 6 pocillos y se incuba de nuevo a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}/5\%$ de CO₂. El día 6 y 7, se lleva a cabo un control microscópico: el proceso de maduración de las células dendríticas se indica mediante “formación de velo”. El día 8, se lleva a cabo con “formación de velo” marcada en el control microscópico la “recogida” de las células dendríticas maduras. Se centrifugan las células dendríticas maduras y se lavan dos veces. Se incorpora el residuo de centrifugación a disolución de NaCl al 0,9%, se cuentan las células viables después de tinción con azul de tripano y se ajustan al número de células deseado con disolución de NaCl al 0,9%.

REIVINDICACIONES

1. Composición obtenible mediante un procedimiento en el que se valora material tumoral, se tritura y se transfiere a una suspensión celular purificada que se incuba con interferón gamma y acetato de tocoferol y se congela, con lo que se forma un lisado de células tumorales,

y en el que se aíslan monocitos a partir de capas leucocitarias o de sangre completa, que a continuación se activan mediante incubación con citocinas para la diferenciación a células dendríticas y se transfieren al estado no adherente,

después de lo cual se descongela una cantidad calculada del lisado de células tumorales congeladas anteriores, se añade como antígeno, se añaden citocinas, se incuba y se recogen las células dendríticas maduras formadas.

2. Composición según la reivindicación 1, en cuya producción se añaden para la diferenciación a células dendríticas inmaduras IL-4 y GM-CSF.

3. Medicamento que contiene una composición según al menos una de las reivindicaciones 1-2.

4. Procedimiento para la preparación de un medicamento, en el que se prepara una suspensión de células tumorales, se destruyen las células tumorales, y en el que se aíslan monocitos a partir de sangre, se induce su diferenciación a células dendríticas,

y se incuban las células dendríticas inmaduras así obtenidas con el lisado celular de células tumorales destruidas, se induce la maduración de las células dendríticas y se recogen las células dendríticas maduras.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que los monocitos se aíslan a partir de capas leucocitarias, sangre entera, leucaféresis o separación de células madre.

6. Procedimiento según la reivindicación 4 y/o 5, en el que la diferenciación de los monocitos a células dendríticas inmaduras se induce mediante citocinas, IL-4 y GM-CSF con o sin interferón gamma.

7. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 4-6, en el que la maduración de células dendríticas inmaduras a maduras se induce mediante prostaglandina E₂ y TNF- α y/o con IL-1 β e IL-6, además de IL-4 y GM-CSF.

8. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 4-7, en el que se prepara la suspensión de células tumorales aislando material tumoral y dado el caso evaluando, triturando y transfiriendo a una suspensión celular purificada.

9. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 4-8, en el que se prepara la suspensión de células tumorales aislando material tumoral autólogo y dado el caso evaluando, triturando y transfiriendo a una suspensión celular purificada.

10. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones 4-9, en el que, antes de la destrucción de las células tumorales, en la suspensión de células tumorales se induce la expresión de complejos proteicos de membrana.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que se induce la expresión de complejos proteicos de membrana mediante interferón gamma y acetato de tocoferol.

12. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que las células tumorales se destruyen mediante congelación.

13. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que las células dendríticas maduras se evalúan por la presencia de rasgos morfológicos típicos (por ejemplo, formación de velo) mediante un control microscópico, y/o se recogen mediante la caracterización de antígenos de superficie por medio de anticuerpos fluorescentes.

14. Uso de la composición según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para terapia tumoral.

15. Uso de la composición según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para vacuna tumoral.