



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2000 00832**

(22) Data de depozit: **22.12.1998**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.06.2010** BOPI nr. 6/2010

(30) Prioritate:

**18.02.1998 US 60/075,111**

(41) Data publicării cererii:

**28.12.2001**

BOPI nr. 12/2001

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. **CA 1998/01190**

(87) Publicare internațională:

Nr. **WO 99/42113 26.08.1999**

(73) Titular:

• **BIONICHE LIFE SCIENCES INC.,**  
**383 SOVEREIGN ROAD, LONDON,**  
**ONTARIO CA**

(72) Inventatori:

• **PHILLIPS NIGEL C., 383 SOVEREIGN**  
**ROAD, LONDON, ONTARIO, CA;**  
• **FILION MARION C., 383 SOVEREIGN**  
**ROAD, LONDON, ONTARIO, CA**

(74) Mandatar:

**CABINET ENPORA S.R.L.,**  
**STR. GEORGE CĂLINESCU, NR. 52A,**  
**AP. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**WO 9908383; US 5888986**

(54) **UTILIZAREA DE PERETE CELULAR (MCC) DE  
MYCOBACTERIUM PHLEI PENTRU TRATAMENTUL  
CANCERULUI DE VEZICĂ URINARĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la utilizarea peretelui celular de *Mycobacterium Phlei* deproteinizat și delipidat, pentru

fabricarea unui medicament destinat cancerului de vezică urinară.

Revendicări: 3

Figuri: 9



1 Invenția se referă la utilizarea de perete celular (MCC) de *Mycobacterium phlei*  
deproteinizat delipidat, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului de  
3 vezică urinară, destinat industriei farmaceutice.

Această cerere încorporează, prin referință și revendicări, întregul avantaj al cererii  
5 provizorii **US 60/075.111** înregistrată în 18 februarie 1998.

Prezenta invenție cuprinde un complex de acid dezoxiribonucleic micobacterian  
7 (ADN-B) - perete celular micobacterian (BCC) în care ADN-B este conservat și complexat  
pe peretele celular bacterian, astfel încât BCC este eficient în tratarea cancerului de vezică.  
9 Mai precis, prezenta invenție cuprinde un complex de ADN de *Mycobacterium phlei* (*M.*  
*phlei*) (ADN-M) - perete celular de *M. phlei* (MCC) în care ADN-M este conservat și  
11 complexat pe peretele celular al *M. phlei* astfel încât MCC este eficient în inhibarea  
proliferării și în inducerea apoptozei celulelor de cancer de vezică.

13 Cancerul este o acumulare de celule atipice într-o rețea aberantă, care poate fi  
rezultatul unui exces de proliferare al unei insuficiențe a apoptozei sau a unei combinații a  
15 celor două. Apoptoza poate fi inițiată de liganzii care se leagă de receptori de pe suprafața  
celulei (Muzio și col., *Cell*, 85: 817-827, 1996). Mutațiile acestor receptori pot duce la o  
17 dereglare a apoptozei. Apoptoza poate fi, de asemenea, indusă de proteine intracelulare,  
care include, dar nu se limitează numai la regulatori p53/p21 (Levine A., *Cell*, 88: 323-331,  
19 1997). Pierderea funcționalității p53/p21 este corelată cu agresivitatea într-o varietate de  
cancere (Fisher D., *Cell*, 78: 529-542, 1994). Agenții chimioterapeutici, pentru efectul lor  
21 terapeutic, se bazează în principal pe inducerea apoptozei în celulele canceroase.  
Rezistența la medicamente, care diminuează eficiența agenților chimioterapeutici, conduce  
23 direct sau indirect la reducerea apoptozei și este în general asociată cu o prognoză slabă  
într-o varietate de cancere.

25 Cancerul de vezică este, în particular, dificil de tratat cu succes (Lamm și col., *Journal*  
*of Urology*, 153: 1444-1450, 1995). Preparatele de origine bacteriană, folosite pentru tratarea  
27 cancerului de vezică, includ, dar nu sunt limitate numai la bacilul Calmette-Guerin (BCG)  
(Pryor și col., *British Journal of Cancer*, 71: 801-807, 1995) și Regressin® (Bioniche, Inc.  
29 London, Ontario, Canada), un extract de perete celular micobacterian (MCWE) fiind formulat  
ca o emulsie de ulei mineral (brevet **U.S. 4,744,984**; Chin și col., *Journal of Urology*,  
31 150: 1189-1193, 1996).

BCG nu induce apoptoza direct (Sasaki și col., *Urology international*, 59: 142-148,  
33 1997). Mai degrabă, BCG stimulează celulele sistemului imunitar pentru a produce molecule  
bioactive, cum ar fi, dar nu se limitează numai la citokinele și tipuri de molecule reactive la  
35 oxigen (Kudoh și col., *British Journal of Urology*, 80S2: 40, 1997) care apoi induc apoptoza  
și citoliza.

37 Se crede că MCWE, care este compus în principal din peptidoglican și glicolipide ce  
conțin N-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamină și derivați de acid micolic (Chin și col., *Journal*  
39 *of Urology*, 156: 1189-1193, 1996), stimulează sistemul imunitar prin activarea reacțiilor  
medicate de macrofag și monocit (Teware și col., *Veterinary Parasitology*, 62: 223-230, 1996).

41 Avantajele terapeutice obținute folosind BCG și MCWE sunt variabile și inconsistente,  
și par să depindă de metoda de preparare și de metoda de eliberare și de variabilitate a  
43 imunogenității și stabilității preparatului rezultat. Mai mult, BCG viu poate provoca efecte  
secundare serioase, care includ, dar nu se limitează numai la febră, sindromuri tip boala  
45 serului, infecții granulomatoase, sepsis și chiar moarte (Lamm și col., *Journal of Urology*,  
147: 596-600, 1992).

47 Alți agenți anteriori, cu acțiune împotriva cancerului de vezică, s-au dovedit, de  
asemenea, mai mult decât nepotrivii pentru aplicații clinice. Mulți dintre acești agenți sunt  
49 ineficienți sau toxici, au efecte secundare semnificative, au, ca urmare, dezvoltarea rezistenței

la medicamente sau imunosensibilizare și produc slăbirea organismelor pacienților. Mai mult, mulți dintre acești agenți depind, pentru eficiența lor, de receptorii de suprafață ai ligandului sau de p53/p21.

Prin urmare, există o cerință pentru un agent terapeutic nou, care să inhibe proliferarea și să inducă apoptoza celulelor cancerului de vezică. Acest agent terapeutic trebuie să fie util ca agent cu acțiune împotriva celulelor de cancer de vezică și ca adjuvant al altor agenți împotriva celulelor de cancer de vezică. Prin adjuvant se înțelege că acesta este util împreună cu alți agenți cu acțiune împotriva celulelor cancerului de vezică, pentru a crește eficiența tratamentului. Mai mult, un asemenea agent terapeutic trebuie să fie simplu și relativ ieftin de preparat, activitatea lui trebuie să fie reproductibilă de la o preparare la alta, activitatea lui trebuie să rămână stabilă în timp, iar efectele sale asupra celulelor cancerului de vezică trebui să fie atinse cu regimuri de dozare care să fie asociate cu o toxicitate minimă.

**WO 99/07383** relatează despre o compoziție și o metodă utilizate pentru reglarea proliferării celulare și a celulelor moarte într-un organism multicelular. În particular, descrie o compoziție ce cuprinde un ADN bacterian (AND-B) și un prim purtător acceptabil farmaceutic, în care AND-B bacterian induce un răspuns în celule unui animal. În particular, prezenta invenție dezvăluie o compoziție care cuprinde un ADN micobacterian (AND-M) și un prim purtător acceptabil farmaceutic, în care AND-M inhibă proliferarea celulară la un animal, induce apoptoza în celulele de răspuns și stimulează celulele corespunzătoare ale sistemului imunitar la un animal, pentru a produce molecule bioactive.

**US 5,888,986** se referă la o metodă de tratament a vezicii urinare și a structurii asociate utilizând acidul hialuronic. Metoda de tratament a cistitei interstițiale cuprinde instilarea directă în vezica urinară și în structurile asociate ale mamiferelor având cistită interstițială, cu soluții conținând acid hialuronic având greutatea moleculară mai jos de  $2 \times 10^5$  Daltons, la concentrație eficientă.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta cerere constă în tratamentul cancerului de vezică urinară.

Soluția constă în utilizarea peretelui celular de *Mycobacterium phlei* (MCC) deproteinizat și delipidat, pentru fabricarea unui medicament destinat tratamentului cancerului de vezică urinară.

Obiectul prezentei invenții constă în utilizarea de perete celular (MCC) de *Mycobacterium phlei* deproteinizat delipidat, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului de vezică urinară la un animal, inclusiv la omul care are cancer de vezică urinară.

Avantajele utilizării prezentei invenții decurg din faptul că medicamentul fabricat, utilizând perete celular (MCC) de *Mycobacterium phlei* deproteinizat delipidat, poate fi preparat în cantități mari, are activitate reproductibilă, este stabil în timp și este puțin toxic, previne, elimină și inhibă eficient cancerul de vezică, prin inducerea apoptozei în celulele cancerului de vezică, singur sau împreună cu alți agenți cu activitate similară.

În continuare sunt prezentate fig. 1...9, după cum urmează:

- fig. 1 - inhibarea proliferării celulelor canceroase HT-1376, HT-1197, B-16 F1, THP-1, RAW 264.7, Jurkat, HL-60 și HL-60 MX-1 de către MCC. Rezultatele reprezintă valoarea medie  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 2 - inhibarea proliferării celulelor de cancer de vezică HT-1376, HT-1197, B-16 F1, THP-1, RAW 264.7, Jurkat, HL-60 și HL-60 MX-1 de către ADN de *M. phlei* (2A) ADN-MCC (2B), ADN de timus de vițel (2A & 2B) și ADN din spermă de hering (2A & 2B). Rezultatele reprezintă valoarea medie  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 3 - inhibarea proliferării celulelor cancerului de vezică la om HT-1197 (3A) și HT-1376 (3B) de către MCC și LPS. Rezultatele reprezintă valoarea medie  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 4 - inducerea fragmentării ADN în celulele cancerului de vezică la om HT-1197 (4A) și HT-1376 (4B), de către MCC netratat și MCC tratat cu DNAază I și de către hIL-12. Rezultatele arătate sunt pentru unul din trei experimente, fiecare dintre acestea producând rezultate similare;

- fig. 5 - eliberarea de NuMA din celulele cancerului de vezică pentru creșteri ale concentrației MCC. Rezultatele reprezintă valoarea medie  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 6 - eliberarea de NuMA din celulele cancerului de vezică la om HT-1197 (6A) și HT-1376 (6B), cu 1  $\mu$ g/ml MCC sau cu 100  $\mu$ g/ml MCC în 48 h. Rezultatele reprezintă valoarea medie  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 7 - eliberarea de NuMA din celulele cancerului de vezică la om, cu 1  $\mu$ g/ml de ADN-MCC netratată și ADN-MCC tratată cu DNAază I și MCC. Rezultatele sunt media  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 8 - procentul de LDH eliberat de către celulele cancerului de vezică la om HT-1197 și HT-1376 ca un indicator al citotoxicității MCC. Rezultatele reprezintă valoarea medie  $\pm$  deviația standard a 3 experimente independente;

- fig. 9 - stabilitatea MCC pe durata a 6 luni de depozitare.

Prezenta invenție satisface cerințele de mai sus prin furnizarea unei compoziții și a unei metode ce cuprinde un complex de acid dezoxiribonucleic micobacterian (ADN-B) - perete celular micobacterian (BCC) în care ADN-B este conservat și complexat pe peretele celular bacterian astfel încât BCC este eficient în tratarea celulelor cancerului de vezică. Mai precis, prezenta invenție satisface cerințele de mai sus prin furnizarea unui complex ADN de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (ADN-M) - perete celular de *M. phlei* (MCC) în care ADN-M este conservat și complexat pe peretele celular *M. phlei* astfel încât MCC este eficient în inhibarea proliferării și inducerea apoptozei la celulele cancerului de vezică. MCC este simplu și relativ ieftin de preparat, activitatea lui este reproductibilă între preparări, rămâne stabil terapeutic în timp și este eficient la regimuri de dozare care sunt asociate cu toxicitate minimă chiar și la administrări repetate.

Pentru prepararea MCC, *M. phlei* sunt crescute într-un mediu lichid și recoltate. Celulele de *M. phlei* sunt scindate, iar componentele solide ale celulelor scindate de *M. phlei* sunt colectate prin sedimentare centrifugală. Componentele solide sunt deproteinizate, delipidizate și sunt spălate. Sunt utilizați agenți fără DNAază, pentru a minimiza degradarea ADN-M în timpul preparării.

MCC, în combinație cu un purtător acceptabil farmaceutic, se administrează unui animal, inclusiv omului, într-o doză suficientă pentru a preveni, trata și elimina celulele canceroase din vezică. Capacitatea neașteptată și surprinzătoare a MCC de a inhiba proliferarea și de a induce apoptoza la celulele cancerului de vezică include, dar nu se limitează numai la celule p52/p21 anormale și celule rezistente la medicamente, adresându-se unei cerințe neîndeplinite din domeniul medical, și asigură un important avantaj.

MCC este, de asemenea, eficient ca un adjuvant, pentru a îmbunătăți eficiența altor agenți anticancer. Aceștia includ medicamente, imunostimulanți, antigene, anticorpi, vaccinuri, radiație, agenți chimioterapeutici, agenți acizi nucleici, agenți obținuți prin bioinginerie, agenți sintetizați chimic, agenți care au drept țintă moleculele morții celulare pentru activare sau inactivare și agenți care inhibă proliferarea și induc apoptoza în celulele răspunzătoare și nu numai.

Prezenta invenție cuprinde un complex de acid dezoxiribonucleic bacterian (ADN-B) - 1  
perete celular bacterian (DCC), în care ADN-B este conservat și complexat pe peretele 3  
celular bacterian astfel încât complexul este eficient în prevenirea, tratarea și eliminarea 3  
celulelor canceroase din vezica urinară a unui animal, inclusiv a omului.

Pentru practica prezentei invenții pot fi folosite multe specii bacteriene, incluzând, dar 5  
nu numai, specii *Coryneform*, specii *Corynebacterium*, specii *Rhodococcus*, specii 7  
*Eubacterium*, specii *Bordetella*, specii *Escherichia*, specii *Listeria*, specii *Nocardia* și specii 7  
*Mycobacterium*. De preferință, se folosesc specii *Mycobacterium*, incluzând, dar nu numai, 9  
*M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. vaccae*, *M. avium* 9  
și *M. phlei*. Cel mai preferabil se folosesc speciile *Mycobacterium M. phlei*.

Prin urmare, prezenta invenție cuprinde mai precis un complex de acid dezoxiribo- 11  
nucleic *M. phlei* (ADN-M) - perete celular de *M. phlei* (MCC), în care ADN-M este conservat 11  
și complexat pe peretele celular de *M. phlei*, astfel încât MCC este eficient în prevenirea, 13  
tratarea și eliminarea celulelor canceroase din vezica urinară. În MCC, cantitatea de ADN-M 13  
este îmbogățită față de cantitatea de ADN-M dintr-o celulă *M. phlei* intactă. Mai mult, ADN-M 15  
este conservat și este complexat pe peretele celular de *M. phlei* astfel încât este mult mai 15  
accesibil la celulele răspunzătoare decât este ADN-M din celula *M. phlei* intactă. Deși nu se 17  
dorește legarea de ipotezele următoare, se crede că ADN-M sub forma oligonucleotidelor 17  
scurte și asocierea lor fizică cu peretele celular *M. phlei* contribuie la exprimarea optimă a 19  
activității terapeutice a MCC.

Metodele de creștere a activității terapeutice a MCC includ, dar nu sunt limitate numai 21  
la suplimentarea chimică sau amplificarea prin biotehnologie a secvențelor stimulative sau 21  
a confirmării de ADN derivat din aceeași specie bacteriană sau din specii diferite și 23  
complexarea ADN-M sau MCC pe purtători sintetici sau naturali. Mai mult, MCC poate fi 23  
administrat înainte, în același timp sau după alți agenți cu acțiune împotriva cancerului de 25  
vezică, pentru a crește eficiența terapeutică.

Compozițiile care cuprind MCC și purtătorul lui acceptabil farmaceutic sunt preparate 27  
prin aducerea în contact, în mod uniform și intim, a MCC cu purtători lichizi, solizi sau de 27  
ambele tipuri. Purtătorii lichizi includ, dar nu numai, purtători apoși, purtători neapoși sau de 29  
ambele tipuri. Purtătorii solizi includ, dar nu numai, purtători biologici, purtători chimici și 31  
purtători prelucrați prin biotehnologii.

Printre purtătorii săi acceptabili farmaceutic, MCC poate fi administrat în suspensie 33  
apoasă, emulsie de ulei, emulsie apă-în ulei-în apă, lipozomi, microparticule, emulsii 33  
specifice situsurilor, emulsii de rezidență îndelungată, emulsii lipicioase, microemulsii, 35  
nanoemulsii, microsfere, nanosfere, nanoparticule, minipompe și cu diverși polimeri sintetici 35  
sau naturali, care permit eliberarea susținută a MCC. Mai mult, MCC poate fi folosit cu 37  
oricare, cu toți sau cu orice combinație de excipienți, indiferent de purtătorul folosit pentru 37  
a expune MCC celulelor răspunzătoare. Aceștia includ, dar nu numai, antioxidanți, tamponi 39  
și bacteriostatice, și pot include agenți de suspendare și agenți de îngroșare.

De preferință, MCC se administrează sub formă de suspensie apoasă. MCC este 41  
suspendat într-un purtător acceptabil farmaceutic, cum ar fi, dar nu este limitat numai la, apă 41  
fără DNAază, soluție salină sau soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), și este emulsionată 43  
prin dezintegrare cu ultrasunete. Opțional, amestecul emulsionat este omogenizat prin 43  
microfluidizare. De exemplu, MCC liofilizat este suspendat în apă fără DNAază și este 45  
dezintegrat cu ultrasunete la o putere de 20%, timp de 5 min (sonicator model W-385, Heat 45  
Systems-Ultrasonics Inc). Compoziția dezintegrată cu ultrasunete este omogenizată prin 47  
microfluidizare la 15.000-30.000 psi într-o trecere (Model M-110Y; Microfluidics, Newton, 47  
MA). Amestecul este ori prelucrat aseptice, ori este sterilizat la final.

Pentru administrarea într-un purtător neapos, MCC este emulsionat cu un ulei mineral sau cu un ulei neutru, cum ar fi, dar nu este limitat numai la, o digliceridă, o trigliceridă, un fosfolipid, un lipid, un ulei și amestecuri ale acestora, în care uleiul conține un amestec adecvat de acizi grași polinesaturați sau saturați. Exemplele includ, dar nu numai, ulei de soia, ulei de canola, ulei de palmier, ulei de măsline și migliol, în care numărul atomilor de carbon din acizii grași sunt între 12 și 22, și în care acizii grași pot fi saturați sau nesaturați. Opțional, lipide sau fosfolipide cu sarcină pot fi suspendate în uleiul neutru. De exemplu, la uleiul de soia cu trigliceride fără DNAază se adaugă fosfatidilcolină într-un raport de 1 g de fosfolipidă la 20 ml de trigliceridă și este dizolvat sub încălzire ușoară la 50-60°C. Se adaugă mai multe grame de MCC într-un rezervor uscat, autoclavizat, iar soluția de fosfolipidă-trigliceridă se adaugă la o concentrație de 20 ml per 1 g de MCC. Suspensia este incubată timp de 60 min la 20°C și apoi este amestecată cu PBS fără DNAază, într-un raport de 20 ml suspensie MCC per litru de PBS. Amestecul este emulsionat prin dezintegrare cu ultrasunete la o putere de 20%, timp de 5 min (sonicator model W-385, Heat Systems-Ultrasonics Inc). Opțional, amestecul MCC emulsionat este omogenizat prin microfluidizare la 15.000-30.000 psi într-o trecere (Model M-110Y; Microfluidics). Emulsia de MCC este transferată într-o sticlă cu capac, autoclavizată, pentru depozitare la 4°C.

Mărimea particulelor MCC trebuie să fie optimă pentru recunoașterea și preluarea de către celulele răspunzătoare. De preferință, diametrul mediu al particulelor de MCC este între aproximativ 10 și aproximativ 10.000 nm, mai preferabil între aproximativ 100 și aproximativ 1000 nm, și cel mai preferabil între aproximativ 250 și aproximativ 600 nm.

Conținutul de ADN-M al MCC este de preferință între aproximativ 0,001 și aproximativ 90 mg/100 mg MCC uscat, mai preferabil între 0,01 și aproximativ 40 mg/100 mg MCC uscat, cel mai preferabil între aproximativ 0,1 și aproximativ 30 mg/100 mg MCC uscat. De asemenea, este de preferat ca acest conținut de proteine să fie mai mic de aproximativ 2 mg/100 mg MCC uscat, iar conținutul de acizi grași să fie mai mic decât aproximativ 2 mg/100 mg MCC uscat. În mod surprinzător, s-a descoperit că cel puțin aproximativ 3,6% din greutatea MCC ca substanță uscată este ADN-M extractabil.

MCC și/sau ADN-M sunt administrate într-o cantitate eficientă pentru a induce răspunsul terapeutic în celulele răspunzătoare ale vezicii. Dozarea MCC și/sau a ADN-M administrate va depinde de starea ce se tratează, formularea particulară și alți factori clinici, cum ar fi greutatea și starea celui căruia îi sunt administrate, precum și calea de administrare. De preferință, cantitatea de MCC și/sau ADN-M administrate este de la aproximativ 0,00001 până la aproximativ 100 mg/kg per doză, mai preferabil de la aproximativ 0,0001 până la aproximativ 50 mg/kg per doză și cel mai preferabil de la aproximativ 0,001 până la aproximativ 10 mg/kg per doză.

Căile de administrare includ, dar nu numai, calea orală, cea intravenoasă, intralezională, intratumorală și intravezicală. De preferință, MCC și/sau ADN-M sunt administrate prin instilare în vezica urinară, prin intermediul unui cateter pentru tractul urinar, dar nu se limitează la acest mod. Alte metode pentru instilarea MCC și/sau ADN-M în vezica urinară sunt cunoscute specialiștilor în domeniu.

Depinzând de calea de administrare, volumul per doză este de preferință aproximativ 0,001 până la aproximativ 100 ml, mai preferabil aproximativ 0,01 până la aproximativ 70 ml și cel mai preferabil aproximativ 0,1 până la aproximativ 40 ml. MCC și/sau ADN-M pot fi administrate într-un tratament cu o singură doză sau în tratamente cu doze multiple, conform unui program și pe o perioadă de timp adecvată bolii care se tratează, stării celui tratat și căii de administrare.

Atunci când este administrată la vezica urinară, depinzând de volumul administrat, 1  
doza trebuie să rămână în vezică de preferință de la aproximativ 1 min până la aproximativ 3  
8 h, de preferință de la aproximativ 15 min până la aproximativ 4 h, și cel mai preferabil de 3  
la aproximativ 30 min până la aproximativ 2 h.

Următoarele 11 exemple vor servi la ilustrarea suplimentară a prezentei invenții, fără 5  
a se constitui totuși într-o limitare a acesteia. Dimpotrivă, trebuie înțeles clar că se poate 7  
recurge la alte variate alcătuiri, modificări și echivalențe ale acestora, care, după citirea 7  
descrierii, le pot apărea specialiștilor în domeniu, fără îndepărtarea de la spiritul prezentei 9  
invenții și/sau întinderea revendicărilor anexate. 9

**Exemplul 1.** Prepararea de MCC din *Mycobacterium phlei* și purificarea de ADN-M 11  
din MCC și din *M. phlei* 11

MCC a fost preparat din *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (tulpina 110), ADN-M a fost 13  
purificat din MCC (ADN-MCC), iar ADN-M a fost purificat din *M. phlei* (ADN-M. *phlei*), așa 13  
cum este descris în cererea PCT/CA981/00744. Toți reactanții au fost selectați pentru a 15  
îmbunătăți conservarea ADN. Dacă nu s-a menționat altfel, MCC, ADN-MCC și ADN-M. *phlei* 15  
au fost resuspendate în apă fără DNAază, sau într-un tampon fără DNAază, acceptabil 17  
farmaceutic, și emulsionate prin dezintegrare cu ultrasunete. MCC, ADN-MCC și ADN-M. 17  
*phlei* nu au conținut endotoxine, așa cum s-a determinat folosind trusa QCL-1000 de lizat 19  
amebocit *Limulus* (BioWhittaker, Walkersville, MD). 19

**Exemplul 2.** Prepararea complexului ADN bacterian - perete celular bacterian și a 21  
ADN bacterian din alte specii bacteriene 21

Complexul din perete celular bacterian ADN bacterian (BCC) și ADN bacterian (ADN- 23  
B) au fost preparate din *M. smegmatis*, *M. fortuitous*, *Nocardia rubra*, *Nocardia asteroides*, 23  
*Corynebacterium parvum*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis* și *M. bovis*, ca în exemplul 1. 23

**Exemplul 3.** Tratament cu DNAază 25

ADN-MCC și MCC, fiecare conținând 1 μg de ADN-M și Regressin® (brevet 27  
U.S. 4.744.984) au fost digerate cu o unitate internațională (IU) de DNAază I fără RNAază 27  
(Life Technologies), timp de 1 h, la 25°C, în 20 mM HCl *tris*, pH de 8,4, 2 mM MgCl și 50 mM 29  
KCl. DNAaza I a fost inactivată prin adăugarea de EDTA până la o concentrație finală de 29  
2,5 mM și încălzire timp de 10 min la 65°C. 29

**Exemplul 4.** Celule și reactanți 31

Celule de cancer de vezică la om HT-1197 și HT-1376 au fost obținute de la 31  
American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) și au fost cultivate în MEM 33  
suplimentat cu aminoacizi neesențiali și vitamine, și conținând 10% FCS (MEM-FCS) (Gibco 33  
Life Science). HT-1197 sunt celule de carcinom anaplastic tranzițional gradul 4 de vezică, 35  
dezvoltate de la un mascul uman. Celulele HT-1197 sunt sensibile la agenți chimioterapeu- 37  
tici, cum ar fi, dar nu sunt limitate numai la doxorubicina. HT-1376 sunt celule de carcinom 37  
anaplastic tranzițional gradul 3 de vezică, dezvoltate de la o femeie. Celulele HT-1376 sunt 39  
p53/p21 anormale și sunt rezistente la agenți chimioterapeutici, cum ar fi cisplatin și 39  
mitomicin, dar nu sunt limitate numai la acestea. Celulele BF-16 F1, THP-1, RAW 264.7, 41  
Jurkat, #L-60 și HL-60MX-1 au fost obținute de la ATCC și au fost cultivate în mediile 41  
recomandate de către ATCC. Dacă nu s-a menționat altfel, celulele au fost cultivate în 6 vase 43  
de cultură tisulară, cu fundul plat, la concentrații între 3 x 10<sup>5</sup> și 10<sup>6</sup> celule/ml, și au fost 43  
menținute la 37°C, într-o atmosferă de 5% CO. 43

ADN din timus de vițel, ADN din spermă de hering și *Escherichia coli* lipopolizaharidă 45  
(LPS) au fost obținute de la Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). IL-12 (hIL-12) recombinant 45  
uman a fost obținut de la R&D Systems (Minneapolis, MN). 47

**Exemplul 5. Inhibarea proliferării celulare**

Proliferarea celulară a fost determinată folosind reducere cu bromură de dimetiltiazol-difeniltetrazolium (MTT) (Mosman și col., *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63, 1983).

Celulele HT-1376, HT-1197, B-16 F1, THP, BAW 264.7, Jurkat, HL-60 și HL-60MX-1 au fost incubate timp de 24 h, cu 0 până la 10  $\mu$ g de MCC, -ADN-*M. phlei*, ADN-MCC, ADN din spermă de hering și ADN din timus de vițel. MCC (fig. 1), ADN-*M. phlei* (fig. 2A) și ADN-MCC (fig. 2B) au inhibat proliferarea într-un mod dependent de doză. ADN din spermă de hering (fig. 2A și 2B) și ADN din timus de vițel (fig. 2A și 2B) nu au inhibat proliferarea. Celulele HT-1197 (fig. 3A) și HT-1376 (fig. 3B) au fost, de asemenea, incubate timp de 24 h, cu 0 până la 100  $\mu$ g/ml de MCC și LPS. MCC a inhibat proliferarea într-un mod dependent de doză, în timp ce LPS nu a inhibat proliferarea (fig. 3A și 3B).

MCC și ADN-M inhibă proliferarea celulelor de cancer de vezică la om HT-1197 și p53/p21 anormale, HT-1376 rezistente la medicamente. Mai mult, inhibarea proliferării celulare nu este comună tuturor ADN-urilor (ADN din spermă de hering și ADN din timus de vițel) și nu a rezultat din imunostimulare nespecifică (LPS).

**Exemplul 6. Inducerea apoptozei așa cum a indicat fragmentarea ADN**

Fragmentarea ADN celular în fragmente de mărimea nucleozomilor este caracteristică celulelor care suferă apoptoză (Newell și col., *Nature*, 357:286-289, 1990). Pentru a evalua fragmentarea ADN, au fost colectate celule neaderente, prin centrifugare la 200 g, timp de 10 min. Peletele de celule neaderente și restul de celule aderente au fost lizate cu 0,5 ml de tampon litic hipoton (tampon 10 mM tris, 1 mM EDTA, 0,2% Triton X-100, pH 7,5). Celulele lizate au fost centrifugate la 13.000 g, timp de 10 min, iar supernatantii ce conțineau fragmente de ADN au fost precipitați peste noapte la -20°C, în izopropanol 50% și 0,5 M NaCl. Precipitatele au fost colectate prin centrifugare și au fost analizate prin electroforeză în geluri de 0,7% agaroză, timp de 3 h, la 100 V.

Celulele de cancer de vezică HT-1197 și HT-1376 au fost incubate timp de 48 h cu 1  $\mu$ g/ml MCC sau cu 1 ng/ml hIL12 (fig. 4). MCC a indus fragmentare semnificativă a ADN la celulele neaderente HT-1197 (fig. 4A, banda 2) și HT-1376 (fig. 4B, banda 2), dar nu și la celulele aderente HT-1197 (fig. 4A, banda 3) și HT-1376 (fig. 4B, banda 3). PBS (fig. 4A și 4B, banda 5), hIL-12 (fig. 4A și 4B, banda 4) și MCC tratat cu DNAază I (fig. 4A și 4B, banda 7) nu au indus fragmentarea ADN la celulele aderente HT-1197 și HT-1376. Celulele netratate (fig. 4A și 4B, banda 1) nu au prezentat fragmentare ADN. S-a utilizat o structură ADN cu 123 baze perechi (Gibco Life Science), pentru a determina greutatea moleculară a fragmentelor ADN de mărimea nucleozomilor (fig. 4A și 4B, banda L).

MCC induce apoptoză la celulele de cancer de vezică HT-1197 și HT-1376, în timp ce MCC tratat cu DNAază I nu induce apoptoză la aceste celule. Acest lucru indică faptul că structura oligonucleotidă intactă a ADN-M este necesară pentru inducerea apoptozei. hIL-12 nu induce apoptoza la celulele HT-1197 și HT-1376.

**Exemplul 7. Inducerea apoptozei așa cum este indicat de către aparatul de solubilizare a proteinelor din nucleul miotic (NuMA)**

Schimbări morfologice pregnante din nucleele celulelor, provocate de solubilizarea și eliberarea de NuMA, sunt caracteristice apoptozei. Eliberarea de NuMA din celulele cultivate a fost determinată în unități/ml (U/ml), folosind un test ELISA comercial (Calbiochem, Cambridge, MA) (Miller și col., *Biotechniques*, 15:1042-1047, 1993).

Celulele cancerului de vezică HT-1197 și HT-1376, incubate timp de 49 h, cu 0 până la 100  $\mu$ g/ml MCC, au eliberat NuMA într-un mod dependent de doză (fig. 5). Celulele HT-1197 (fig. 6A) și HT-1376 (fig. 6B), incubate cu 1  $\mu$ g/ml sau cu 100  $\mu$ g/ml de MCC, timp de 48 h,

au prezentat o eliberare îmbunătățită de NuMA în 24 h. Celulele HT-1197, incubate timp de 48 h cu MCC sau cu ADN-MCC, au prezentat o eliberare semnificativ mai mare de NuMA cu MCC decât cu ADN-MCC (fig. 7). Tratarea MCC și ADN-MCC cu DNAază I a redus semnificativ eliberarea de NuMA (fig. 7).

Inducerea de către MCC a apoptozei la celulele cancerului de vezică HT-1197 și HT-1376 este dependentă atât de timp, cât și de doză. Deși nu se dorește legarea de către ipotezele următoare, se crede că atât structura de oligonucleotidă a ADN-M, cât și prezentarea ADN-M pe peretele celular de *M. phlei* este importantă pentru inducerea apoptozei optime.

## **Exemplul 8. Citotoxicitatea MCC**

Citotoxicitatea celulară este caracterizată de pierderea integrității membranei plasmatice și eliberarea de enzime citoplasmice, cum ar fi, dar nu numai, LDH (Phillips și col., *Vaccine*, 14: 898-904).

Pentru a evalua citotoxicitatea MCC, s-au incubat celule de cancer de vezică la om HT-1197 și HT-1376, timp de 48 h, cu 0 până la 100 μg/ml de MCC sau cu tampon lizat (10 mM tris, 1 mM EDTA, 0,2% Triton X-100, pH 7,5), ca un control total, pentru eliberarea de LDH (Filion și col., *Biochim Biophys Acta*, 1329: 345-356, 1997). LDH a fost determinat prin evaluare comercială (Sigma-Aldrich). Faptul că MCC nu a fost citotoxic (fig. 8) demonstrează că MCC acționează direct asupra celulelor de cancer de vezică HT-1197 și HT-1376, pentru a inhiba proliferarea și a induce apoptoza.

## **Exemplul 9. Tratatamentul cancerului uman de vezică cu MCC și ADN-MCC la șoareci nu/nu**

Cancerul uman de vezică (HT-1197) este indus ca o tumoră solidă ectopică în țesuturile subcutanate ale șoarecilor fără păr, atimici imunodeficienți (șoareci nu/nu), iar șoarecii sunt împărțiți în 5 grupuri. Grupul 1 primește numai purtător. Grupul 2 primește MCC. Grupul 3 primește MCC tratat cu DNAază I. Grupul 4 primește ADN-MCC. Grupul 5 primește ADN-MCC tratat cu DNAază I. Masa canceroasă este cântărită înaintea tratamentului și săptămânal, timp de 4 săptămâni de tratament. Grupul 2 de șoareci prezintă regresie a masei canceroase. Grupurile 1, 3 și 5 de șoareci nu prezintă regresie a masei canceroase.

## **Exemplul 10. Tratatamentul cu MCC a cancerului de vezică la om**

10 pacienți cu cancer de vezică ortotopic, de stadiul 3, sunt împărțiți în 2 grupuri. Grupul 1 primește intravezical instilații cu MCC, timp de 8 săptămâni. Grupul 2 primește tratament standard chimioterapeutic. Pacienții din grupul 1 prezintă regresie semnificativă a cancerului de vezică și nu prezintă efecte secundare debilitante. Pacienții din grupul 2 prezintă regresie minimă a cancerului de vezică și efecte secundare debilitante semnificative.

## **Exemplul 11. Stabilitatea MCC**

MCC la 1 μg/ml a fost depozitat ca o suspensie sterilă în 0,85% w/v NaCl în întuneric, la 4°C, timp de 6 luni. Diametrul mediu al particulelor a fost calculat folosind spectroscopia cu corelare fonică (N4 Plus, Coulter Electronics Inc.). Suspensia de MCC a fost diluată cu NaCl 0,85% w/v până la o viteză de numărare între  $5 \times 10^4$  și  $10^6$  indicații/s. Diametrul mediu al particulelor a fost calculat în modul de prelucrare a distribuției mărimilor (SDP), folosind următoarele condiții: indexul de refracție a fluidului 1,33; temperatura 20°C, viscozitatea 0,93 centipoise, unghiul de măsurare 90,0°, timpul de eșantionare 10,5 μs și timpul de rulare a probei 100 s. Potențial, încărcătura electrică la interfața hidrodinamică dintre particule și solventul vrac a fost măsurată într-un aparat Delsa 440SX (Coulter Electronics), folosind următoarele condiții: curent 0,7 mA, frecvență 500 Hz, temperatura 20°C, indicele de refracție al fluidului 1,33, viscozitatea 0,93 centipoise, constanta dielectrică 78,3, conductivitatea 16,7 ms/cm, timp de conectare 2,5 s, timp de deconectare 0,5 s și timpul de rulare a probei 60 s.

## RO 122992 B1

- 1           Așa cum este arătat în fig. 9, încărcarea MCC și diametrul MCC rămân relativ  
neschimbate timp de 6 luni de depozitare. Mai mult, stimularea de către MCC a producerii  
3 de IL-12 și inducerea apoptozei la monocitele THP-1 rămân neschimbate pe perioada celor  
6 luni de depozitare.
- 5           Trebuie înțeleas, desigur, că ceea ce s-a prezentat aici se referă numai la o alcătuire  
preferată a prezentei invenții și că pot fi făcute numeroase modificări sau schimbări, fără  
7 îndepărtarea de la spiritul și întinderea invenției, așa cum este prezentată în revendicările  
anexate.

# RO 122992 B1

## Revendicări

- |                                                                                                                                                                                                                                                  |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|                                                                                                                                                                                                                                                  | 1 |
| 1. Utilizarea de perete celular (MCC) de <i>Mycobacterium phley</i> deproteinizat delipidat, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul cancerului de vezică urinară la un animal, inclusiv la omul care are cancer de vezică urinară. | 3 |
| 2. Utilizare conform revendicării 1, în care MCC induce răspuns în celulele cancerului de vezică urinară selectat din grupul ce constă din inhibarea proliferării celulelor cancerului de vezică și inducerea apoptozei în cancerul de vezică.   | 5 |
| 3. Utilizare conform revendicării 2, în care celulele cancerului de vezică urinară sunt rezistente la medicație sau la factorul p 53/21 anormal.                                                                                                 | 7 |
|                                                                                                                                                                                                                                                  | 9 |

(51) Int.Cl.  
A61K 35/74 (2006.01),  
A61K 31/70 (2006.01)

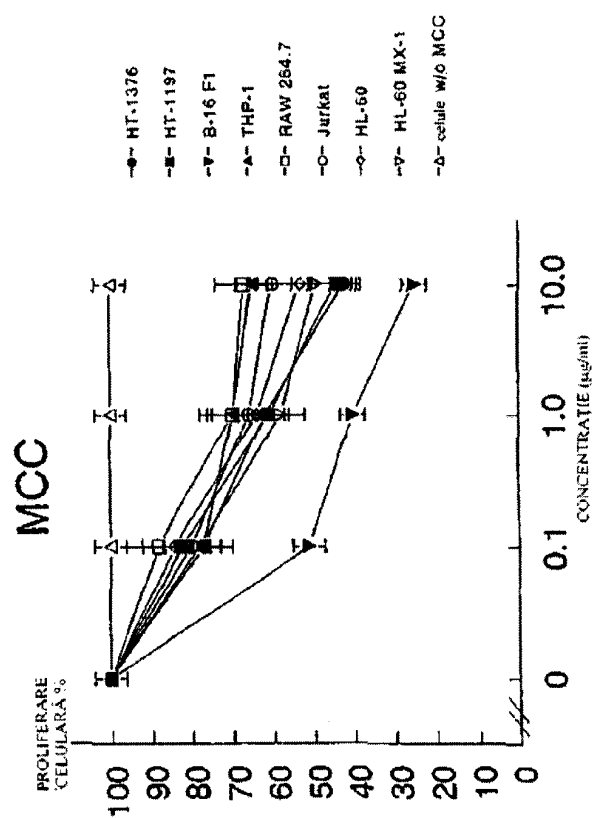


Fig. 1

(51) Int.Cl.  
A61K 35/74 (2006.01),  
A61K 31/70 (2006.01)

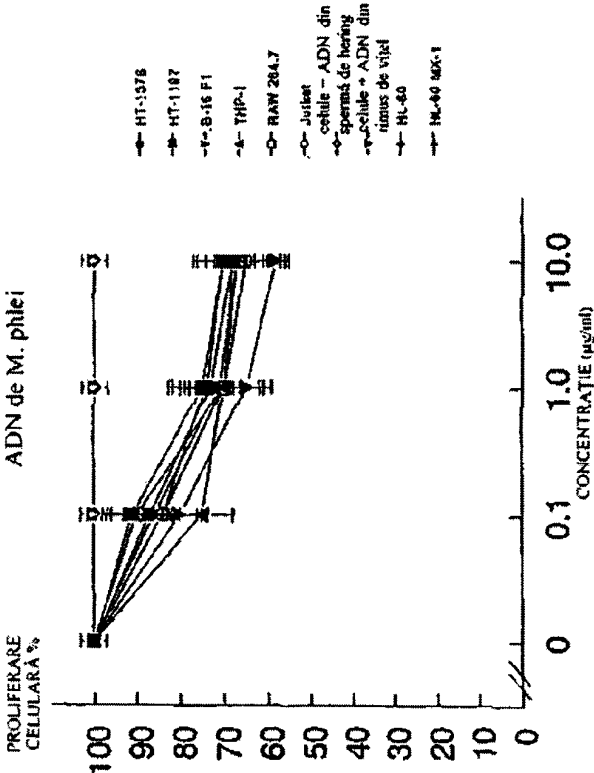


Fig. 2A

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/74** (2006.01),  
**A61K 31/70** (2006.01)

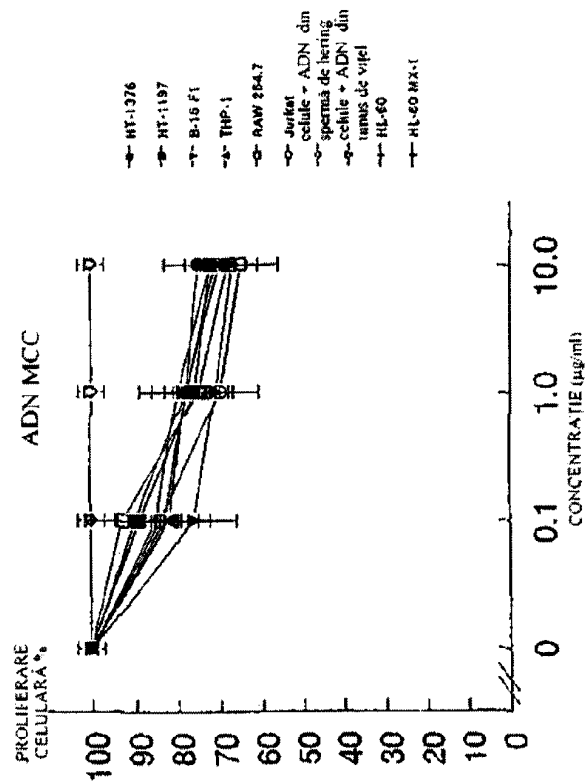
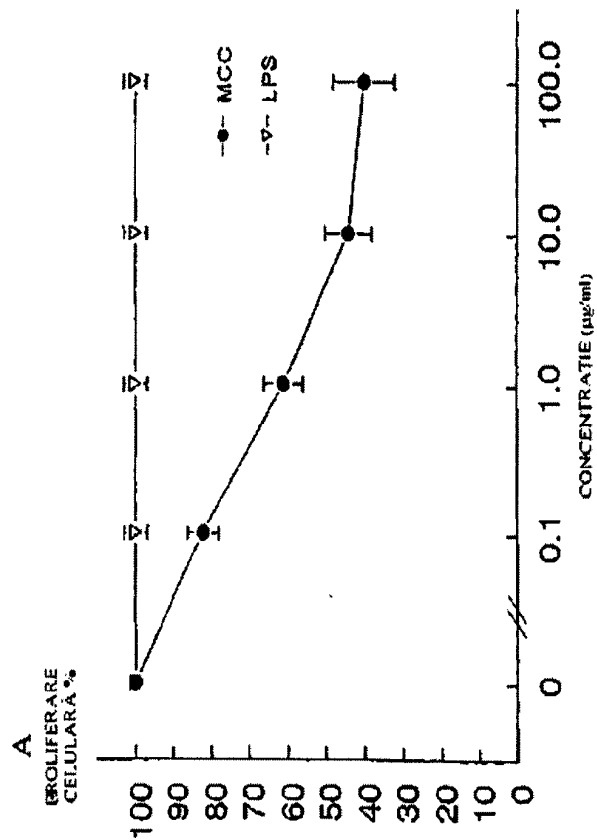


Fig. 2B

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/74** (2006.01),  
**A61K 31/70** (2006.01)



**Fig. 3A**

(51) Int.Cl.  
A61K 35/74<sup>(2006.01)</sup>,  
A61K 31/70<sup>(2006.01)</sup>

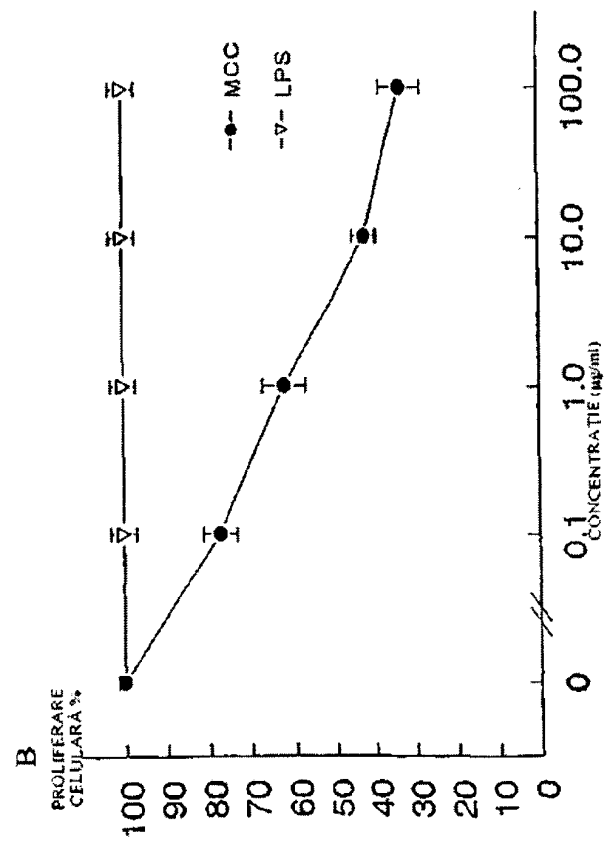


Fig. 3B

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/74** (2006.01),  
**A61K 31/70** (2006.01)

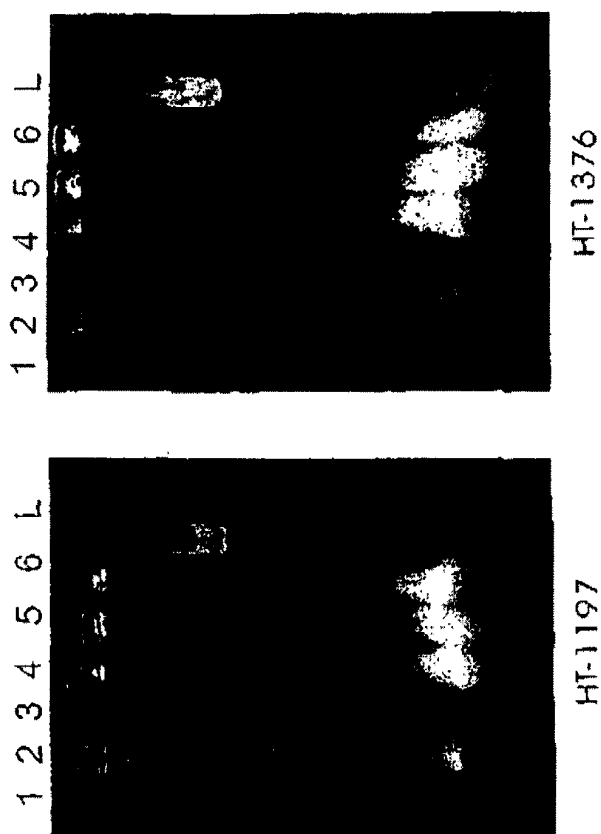


Fig. 4

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/74** (2006.01),  
**A61K 31/70** (2006.01)

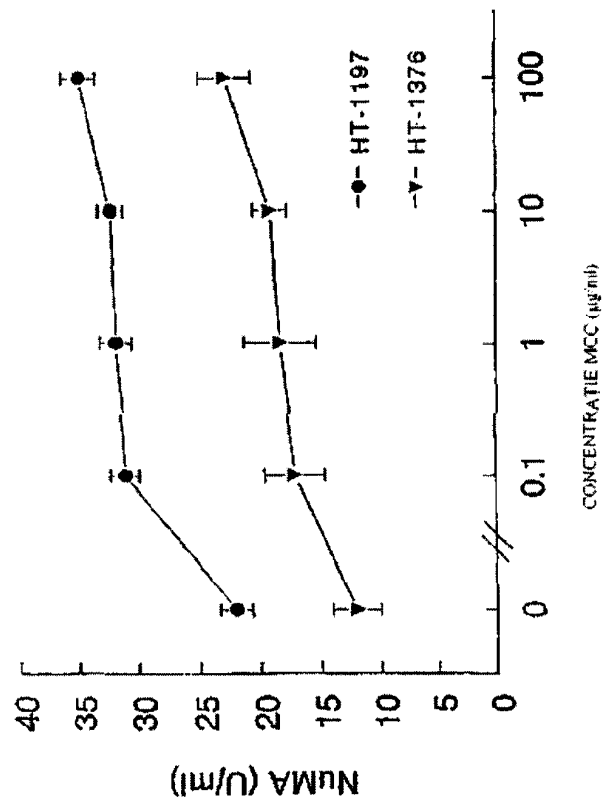


Fig. 5

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/74** (2006.01),  
**A61K 31/70** (2006.01)

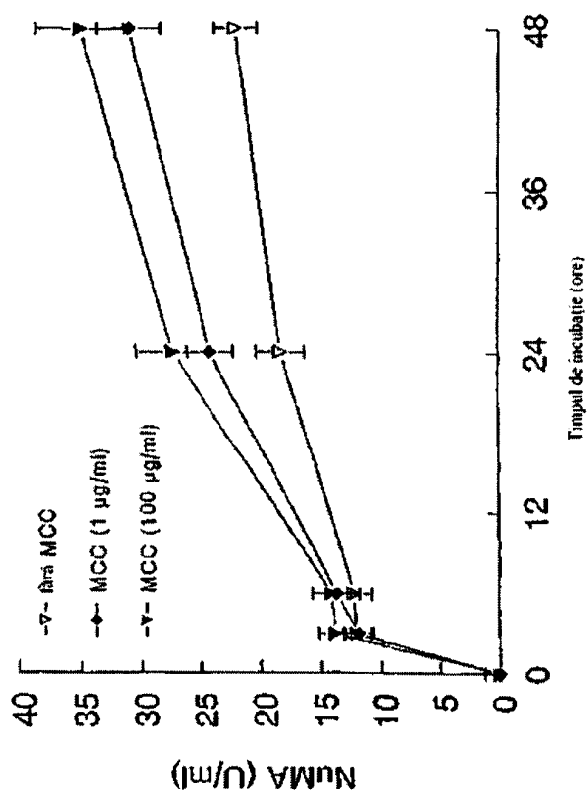


Fig. 6A

(51) Int.Cl.  
**A61K 35/74** (2006.01),  
**A61K 31/70** (2006.01)

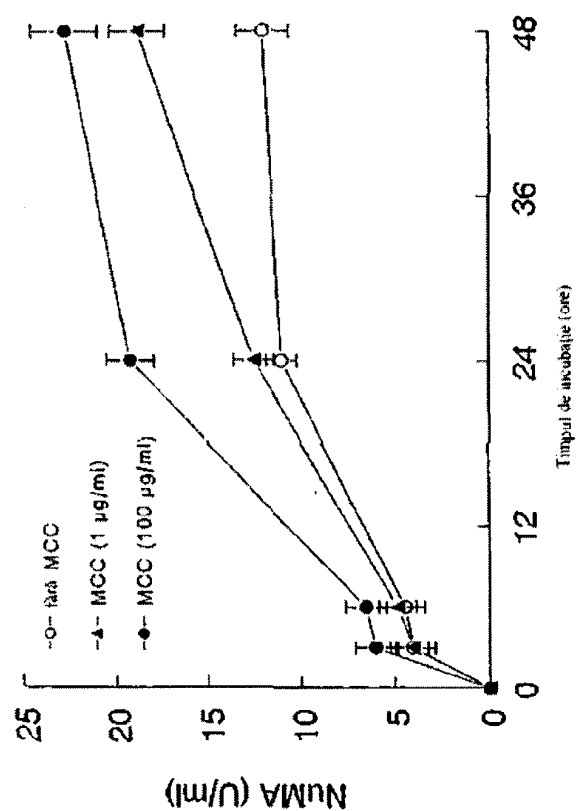


Fig. 6B

(51) Int.Cl.  
A61K 35/74 (2006.01),  
A61K 31/70 (2006.01)

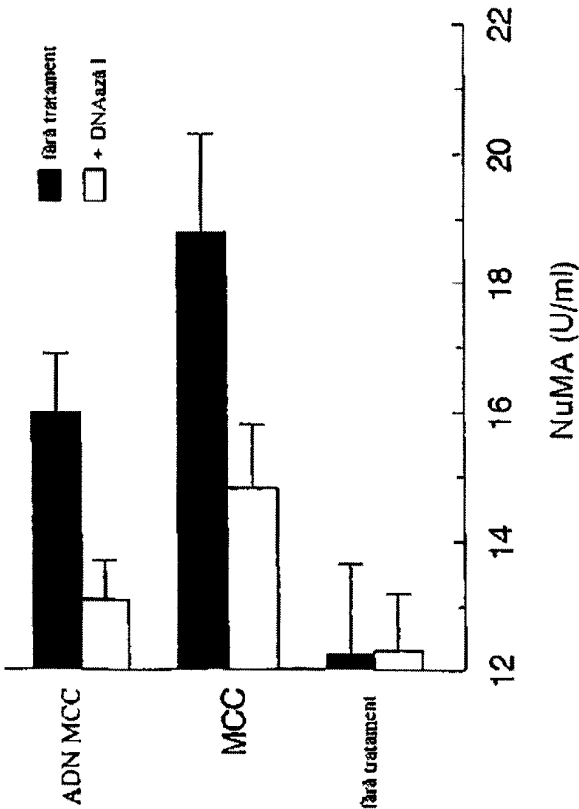


Fig. 7

(51) Int.Cl.  
A61K 35/74 (2006.01);  
A61K 31/70 (2006.01)

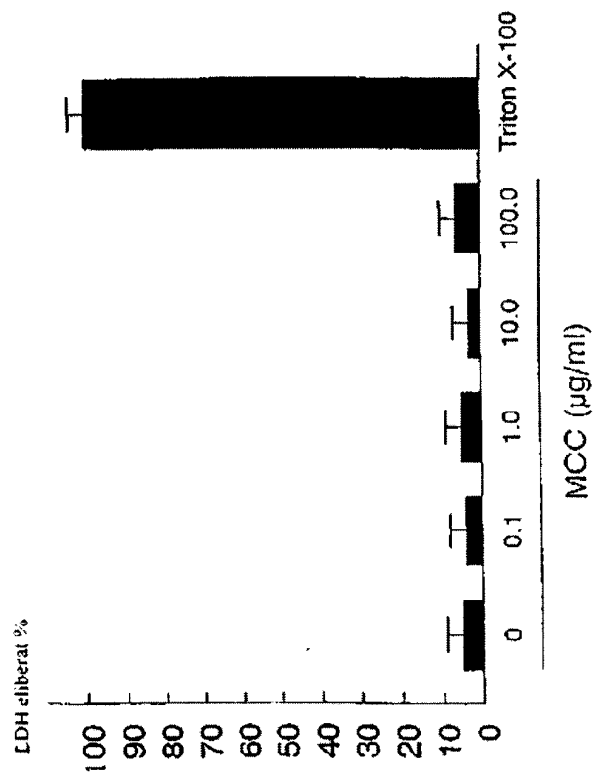


Fig. 8

(51) Int.Cl.  
A61K 35/74 (2006.01),  
A61K 31/70 (2006.01)

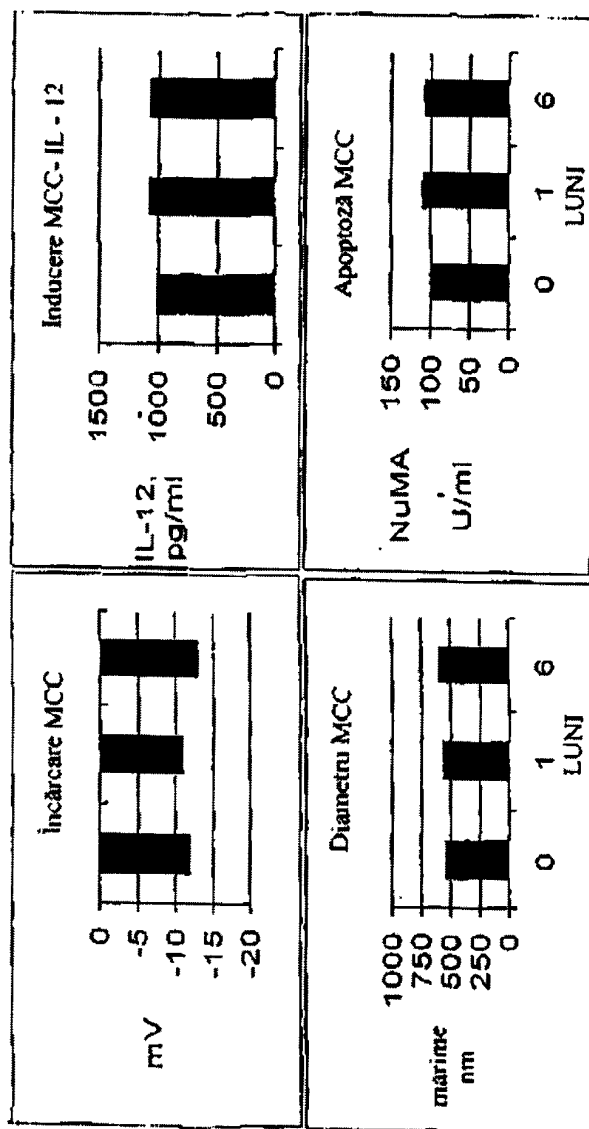


Fig. 9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci