

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.08.05	(73) Titular(es): IRX THERAPEUTICS, INC.
(30) Prioridade(s): 2003.08.08 US 637869	140 WEST 57TH STREET, SUITE 9C NEW YORK,
(43) Data de publicação do pedido: 2006.05.10	NY 10019 US
(45) Data e BPI da concessão: 2011.10.05 011/2012	(72) Inventor(es): JOHN W. HADDEN US
	(74) Mandatário: GONÇALO DA CUNHA FERREIRA AV. ENG. DUARTE PACHECO, TORRE 1 - 3º 1070-101 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA IMUNOTERAPEUTICA PARA PACIENTES IMUNO SUPRESSIVOS**

(57) Resumo:

UM MÉTODO DE IMUNOTERAPIA PARA TRATAMENTO DO CANCRO O UM TRATAMENTO SINÉRGICO ANTI-CANCRO POR ADMINISTRAÇÃO DE UMA QUANTIDADE EFECTIVA DE UMA MISTURA DE CITOCINAS NATURAIS (NCM), UMA QUANTIDADE EFECTIVA DE CICLOFOSFAMIDA (CY), OU UMA QUANTIDADE EFECTIVA DE INDOMETACINA (INDO), ONDE A NCM, CY OU INDO SÃO ADMINISTRADAS NA SUA FORMA SIMPLES OU EM COMBINAÇÃO. UM MÉTODO DE TRATAMENTO ANTI-METASTÁTICO PROMOVEDO DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS IMATURAS NOS MODOS LINFÁTICOS; PERMITINDO A SUA APRESENTAÇÃO; E PREVENINDO O DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES. UM MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DA NCM COMO DIAGNÓSTICO TESTE CUTÂNEO PREVENDO RESULTADO TRATAMENTO. UM MÉTODO DE PRÉ-TRATAMENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC) E UM MÉTODO DE TRATAMENTO DE INSUFICIÊNCIA DE MONOCITOS CARACTERIZADO PELA HISTIOCILOSE SINUSAL OU UM TESTE CUTÂNEO NEGATIVO NCM. COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA ELEGER UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS TUMORAIS ENDÓGENOS OU EXÓGENOS.

RESUMO

VACINA IMUNOTERAPEUTICA PARA PACIENTES IMUNO SUPRESSIVOS

Um método de imunoterapia para tratamento do cancro o um tratamento sinérgico anti-cancro por administração de uma quantidade efectiva de uma mistura de citocinas naturais (NCM), uma quantidade efectiva de ciclofosfamida (CY), ou uma quantidade efectiva de indometacina (INDO), onde a NCM, CY ou INDO são administradas na sua forma simples ou em combinação.

Um método de tratamento anti-metastático promovendo diferenciação e maturação de células dendríticas imaturas nos modos linfáticos; permitindo a sua apresentação; e prevenindo o desenvolvimento de metástases. Um método de utilização da NCM como diagnóstico teste cutâneo prevendo resultado tratamento. Um método de pré-tratamento de células dendríticas (DC) e um método de tratamento de insuficiência de monocitos caracterizado pela histiocitose sinusal ou um teste cutâneo negativo NCM. Composições e métodos para eleger uma resposta imunológica a antígenos tumorais endógenos ou exógenos.

DESCRIÇÃO

VACINA IMUNOTERAPEUTICA PARA PACIENTES IMUNO-SUPRESSIVOS

A presente invenção refere-se a uma vacina terapêutica para pacientes com cancro.

Tornou-se cada vez mais evidente que os cancros humanos têm antígenos, os quais após reagidos pelo sistema imunológico do hospedeiro, levam à regressão do tumor. Estes antígenos foram definidos por ambas abordagens sorológicos e celulares imunológicas. Isto levou à definição de ambos os epítomos de células B e T (Sahin U, et al, Curr Opin Immunol 9:709-715, 1977; Van der Eynde, B, et al. Curr Opin Immunol 9:684-693, 1997; Wang RF, et al., Immunologic Reviews 170:85-100, 1999). Com base nestes resultados, tornou-se uma meta de cancro imunoterapeutas de induzir regressão de tumores. No entanto, historicamente, os esforços bem sucedidos têm sido esporádicos e geralmente menores em frequência e magnitude.

Um problema fundamental no esforço para imunizar pacientes com cancro é que o estado do comportamento do tumor está associado a mecanismos imuno-supressivos ambos derivados do tumor e do perturbado sistema imune do hospedeiro (Kavanaugh DY, et al, Hematol-Oncol Clinics of North Amer 10(4):927-951,1996), tornando assim difícil a imunização e até agora impossível numa base consistente. Supressão imunológica ou esgotamento envolve uma capacidade reduzida do sistema imunológico para responder. Tal supressão pode ser induzida mediante drogas ou doença. A condição pode ser induzida por tratamento de drogas, vírus induzido como na AIDS, ou induzida por um estado de doença como o cancro. O sistema imunológico nesta condição é efectivamente desligado.

Uma variedade de estratégias de tumor imunização tem sido desenvolvida. No entanto, todas essas estratégias são complexas e afastam significativamente das estratégias de imunização convencional usadas para doenças infecciosas (Weber J. Tumor, Medscape Anthology 3:2, 2000). Uma tal estratégia de tumor imunização envolve um material vendido sob a marca Theratope, um antígeno de polissacarídeo mucina Sialyl TN conjugado com hemocianina limpet keyhole e administrado com micobactéria adjuvante Detox (Detox é uma marca) e dose baixa de ciclofosfamida (Maclean G D, et al, J Immunother Enphasis Tumor Immunol 19(4):309-316,1996). Todavia, o uso desta vacina em pacientes com cancro de mama metastático e cancro do ovário tem revelado respostas clínicas superiores numa baixa percentagem de

pacientes. A resposta principal significa redução tumoral superior a 50%.

Terapia genética também tem sido intentada usando um adenovírus construído como um vector de expressão para genes definidos do vírus Papiloma peptídeo 16 foi utilizado para imunização ou pacientes com cancro cervical e revelou respostas clínicas superiores numa baixa percentagem de pacientes (Borysiewicz L K, et al, Lancet 347:1524-1527, 1996).

Tem também tem sido intentada terapia célula dendrítica mediada, em que as células dendríticas são pulsadas com fragmentos oligopeptídeos de antígenos específicos da próstata (PSA). Antígeno específico de membrana prostática (PSMA) tem sido usado em pacientes com cancro metastático da próstata com respostas clínicas superiores numa baixa percentagem de pacientes (Sandra M G, et al, Urology 52:2, 1999; Murphy GP, et al The Prostate. 38:43-78, 1999).

Adicionalmente, tumores autólogos têm sido utilizados com baixa dose de ciclofosfamida e BCG para imunizar pacientes de cancro com melanoma maligno. No entanto, algumas respostas clínicas foram relatadas (Mastrangelo M J, et al, Seminars in Oncology 23(6):773-781, 1996). Outra estratégia intentada incluiu o uso de antígenos MAGE com uma variedade de adjuvantes de vacinas. Novamente, isso tem revelado algumas, se as houver, respostas em pacientes com melanoma maligno.

Patentes US 5503841; 5800810; 6060068; 5643565 e 5100664 (todas em nome de Doyle) divulgam métodos para melhorar a resposta imunitária em pacientes usando Interleucina 2 - (IL-2). Este método é revelado para uso em resposta a doenças infecciosas e principalmente funções primárias utilizando antígenos conhecidos por serem imunológicos.

Conforme anteriormente divulgado, o tratamento do cancro é conhecido por exigir abordagens diferentes. Até ao momento, o tratamento com IL-2 tem mostrado efeitos menores em dois tipos de cancro, células renais e melanoma maligno (taxa de resposta inferior a 20%). É geralmente considerado ineficaz em células cancerosas escamosas na cabeça e pescoço (H&NSCC); no cancro cervical e no cancro de próstata. Por isso, não é aprovado para estes usos. Não seria, portanto óbvio, com base no método das patentes acima para uso de pequenos peptídeos no tratamento do cancro.

É importante contrastar prevenção com antígenos conhecidos "clássico" de estrutura complexa e de alto peso molecular em pacientes saudáveis versus tratamento (geralmente sem sucesso) com antígenos ou peptídeos tumorais (geral sem sucesso) em pacientes imuno-suprimidos (geralmente sem sucesso). O primeiro é fácil e nossas vacinas virais actuais atestam a sua eficácia.

O último é quase impossível numa base rotineira, apesar de 30 anos de intenso esforço.

A imunização já foi proposta com peptídeo endógeno processado e apresentado pelas células dendríticas ou endogenamente administradas a um ambiente (modo linfático) onde células dendríticas foram preparadas e podem ser apresentadas eficazmente a células T. Isto foi já considerado ser um desafio insuperável. Peptídeos são muito mais pequenos para serem imunógenos eficazes; a sua meia-vida é curta são muitas vezes antígenos próprios não mutados para os quais o paciente é imunologicamente tolerante e ganhando uma resposta é equivalente a induzir auto imunidade.

Em várias das estratégias acima, imunidade celular e / ou tumoral de tumor-antígenos associados foi induzido (Weber J. Tumor, Medscape Anthology 3:2, 2000; Maclean G D, et al, J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(4):309-316, 1996, Borysiewicz L K, et al, Lancet 347:1524-1527, 1996; Sanda M G, et al, Urology 52:2, 1999). Isto é assim especialmente em associação com a regressão do tumor. No entanto, a taxa de sucesso desses tratamentos é insignificante e inconsistente (<30%).

NCM, uma mistura de citocinas não-recombinantes, é agora conhecida por ser activa numa imunização não bloqueada num modo linfático regional. NCM, conforme definido nas patentes US 5632983 e 5698194, é (em breve), preparado na presença contínua de um antibiótico 4 aminoquinolone e com a presença contínua ou pulsada de um mitógeno, o qual nas modalidades preferidas é PHA.

WO02/34119 e WO03/035004 ambas divulgam o uso de tal mistura natural de citocinas (NCM), a qual inclui as citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-gama, TNF alfa, G-CSF e GM-CSF, para o tratamento de pacientes com cancro, geralmente por injeção, resultando em maturação das células dendríticas imaturas nos modos linfáticos regionais. Estes documentos dão uma grande quantidade de informação no que diz respeito a como o NCM pode ser administrado (geralmente por injeção em torno de vasos linfáticos que drenam para os modos linfáticos), em algumas modalidades, juntamente com timosina $\alpha 1$. A NCM pode ainda ser administrada juntamente com ciclofosfamida (CY) e um medicamento anti-inflamatório não-esteroidal (NSAID), tal como a indometacina (INDO).

Instruções detalhadas e exemplos são dadas em ambos os documentos de modo de administração e modo de acção para pacientes imunodeprimidos, por exemplo, juntamente com um "adjuvante", o qual pode aumentar a resposta imune a um antígeno particular, e junto com um tumor exógeno ou endógeno antígeno associado.

Exemplo 1 de W003/035004 divulga pré-teste dos pacientes com um teste de pele utilizando NCM, mas a terapia com NCM é apenas indicada depois de um resultado positivo, mostrando resposta a NCM. Por outras palavras, o uso de NCM é contra-indicado após ser obtido um resultado tão negativo. Análise mais aprofundada dos dados clínicos, patológicos e de sobrevivência do estudo do tal Exemplo oferece mais conhecimento profundo no que se refere à imunização de pacientes com cancro aos seus próprios antígenos tumorais autólogos e a regressão imunitária resultante de seus tumores.

Nos desenhos anexos, a Figura 1, a qual é um gráfico ilustrando a percentagem de sobrevivência de pacientes tratados em 48 meses, mostra que o tratamento de pacientes com NCM (referido como IRX-2) está associado com aumento da sobrevivência em 48 meses ($p < 0,001$).

A Figura 2 é um gráfico ilustrando a sobrevivência completa e parcial de respondentes comparada ao inferior e não-respondente, como será aqui explicado. A figura mostra que as respostas clínicas determinam a sobrevivência, em que pacientes com resposta completa (CR) e resposta parcial (PR) (>50% redução tumor) têm melhor taxa de sobrevivência que aqueles com respostas inferiores (MR) (<50%, mas >24% de redução tumoral) ou nenhuma resposta (NR) (> 25%) ($p < 0,01$).

Figura 3, que é um gráfico ilustrando a relação do índice de patologia para a sobrevivência, mostra que pacientes com fortes respostas patológicas (índice de 6 a 9) tem melhor taxa de sobrevivência que aqueles com respostas patológicas mais fracas (<6) ($p < 0,02$).

Figura 4, que é um gráfico mostrando a relação de infiltração de linfócitos para a sobrevivência mostra que a infiltração linfóide no tumor como variável única prediz sobrevivência.

Figura 5 é um gráfico ilustrando a percentagem de sobrevivência (dose resposta) dos pacientes tratados em 24 meses, onde "x" é igual a cerca de 100 IU/mL de IL-2.

Análise Chi Square da relação de resposta clínica à resposta patológica nas figuras acima mostra uma relação altamente significativa ($p < 0,01$) indicando que os dois estão coordenadamente relacionados um em relação ao outro, bem como para a sobrevivência e, assim, proporciona uma triangulação estatística dos dados respostas clínicas inter-relacionadas, os parâmetros de regressão imunológica e sobrevivência. Tais relacionamentos nunca foram mostrados para imunoterapia do cancro humano.

Isso levou à descoberta surpreendente que pode ser vantajosa para administrar a NCM num paciente com cancro o qual mostra um resultado negativo do teste de pele a um teste de pele NCM.

Consequentemente, a presente invenção compreende utilização de uma mistura de citocinas naturais (NCM), incluindo as citocinas L-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-gama, TNF-alfa, GM-CSF e G-CSF (incluindo recombinantes do mesmo), por imunoterapia de um paciente com cancro num regime de dosagem compreendendo

- (i) aplicação de uma quantidade da referida mistura de citocinas naturais em teste cutâneo para um paciente com cancro de tal forma que a dita aplicação mostra uma resposta clínica positiva ou negativa ao dito teste cutâneo no prazo de 24 horas, e
- (ii) a administração intradérmica subsequente da referida mistura de citocinas naturais para um paciente com cancro a qual mostra a dita resposta clínica negativa para a dita aplicação na etapa (i).

Características preferidas da presente invenção são definidas nas reivindicações subsidiárias.

A figura acima mencionada 5 ilustra uma série de doses de NCM na sobrevivência total de 24 meses. Um impacto óptimo sobre a sobrevivência está acima do limite de 100-233 equivalente a este valor tem impacto óptimo na sobrevivência. Nenhum efeito foi observado em cerca de 16 unidades e efeito inferior em cerca de 1.320 unidades.

Conforme descrito anteriormente na WO02/34119 e WO03/035004 acima mencionadas, a NCM para uso de acordo com a invenção é de preferência para injeção em torno de vasos linfáticos que drenam para os modos linfáticos regionais a um tumor.

A NCM é preferencialmente co-entregue com CY e um NSAID. Os NSAID de escolha são a indometacina (INDO). No entanto, o ibuprofeno, celecoxib, rofecoxib e outros inibidores Coxll podem também ser usados como NSAID. Efeitos colaterais dos NSAIDs devem ser agressivamente tratados com inibidores do protão e um análogo de prostaglandina E.

Zinco e multi-vitaminas são agentes úteis para ajudar a restaurar a imunidade celular T, possivelmente incluindo a adição de selênio. Dosagem de zinco preferível é de 50 a 75 mg. Um suplemento standard multivitamínico pode ser administrado. O zinco pode ser um gluconato disponível.

A presente invenção será agora ilustrada com referência ao exemplo a seguir executado.

EXEMPLO

Como acima mencionado, WO 03/035004 sugere que pacientes com um teste intradérmico cutâneo negativo para o NCM podem mostrar resposta clínica deficiente.

No entanto, agora temos acumulado uma série de pacientes de teste cutâneo negativo e descoberto que eles mostram alterações semelhantes à combinação CY e INDO sem NCM significativa. Dez pacientes apresentaram teste cutâneo negativo (incluindo quatro do Hospital Juarez) com NCM (i.e. que não respondem a NCM) e foram tratados com a NCM mais CY e INDO. Estes pacientes tinham resposta clínica deficiente, menor redução e fragmentação tumoral, e sobrevivência deficiente (20%) (Ver Tabela 1). Estas observações confirmam a conclusão de que INDO e CY marcaram actividade sem NCM.

Com importância eles confirmam que o teste cutâneo é fundamental para prever as respostas clínicas enfáticas e patológicas que se relacionam com a sobrevivência melhorada. Além disso, um teste cutâneo negativo prediz a falha dos pacientes em responder à cirurgia com ou sem radioterapia. O teste cutâneo NCM pode ser muito bem empregue para prever o resultado terapêutico em H & N SCC. Anteriormente, o teste cutâneo com dinitroclorobenzeno (DNCB) mostrou significância prognóstica em H & N SCC, mas devido ao procedimento complicado de sensibilização que exige, não é mais usada clinicamente. O teste cutâneo NCM oferece um teste conveniente 24 horas. Curiosamente, estes pacientes divididos em dois grupos. Em um grupo, a Tabela I (b), as respostas foram especialmente deficientes, sem sobreviventes. No outro grupo, a Tabela I (a) a seguir, estes pacientes converteram o teste NCM negativo em um tratamento positivo e mostraram respostas clínicas e patológicas e sobrevivência semelhante aos pacientes on-protocolo.

Um destes pacientes tinha um tumor considerado inoperável e foi mostrado para converter o teste negativo em positivo e permitiu um segundo tratamento para reduzir clinicamente o tumor e por critérios patológicos e permitir a sobrevivência prolongada após cirurgia (> 7 anos). Este pré-tratamento de pacientes com teste cutâneo negativo NCM pode aumentar as taxas de resposta. NCM mais timosina α_1 também pode ser previsto para o trabalho (Veja, Estados Unidos Pedido Publicado N.º 20030124136). O teste cutâneo negativo NCM reflecte uma insuficiência de monócitos e tratamento e com citocinas monócitos-activos na forma natural ou recombinante seria previsto para ser vantajoso na sua forma simples ou em combinação. Estes incluem, mas não estão limitados a, GM-CSF, M-CSF, IFN- δ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e outros.

Quadro I: Pacientes Teste Cutâneo Negativo NCM

Quadro I(a)

Pacien te N.º	Iniciais Paciente	Tumor %	Sólido %	Frag. %	Estroma %	Linf. %	Redução Absoluta Tumor	Subj. Resp.	Estado
Teste cutâneo negativo NCM alterada para positiva									
13	ANA	48	15	33	16	36	42	PR	Vivo > 24Mos.
15	ICV	70	63	7	6	24	5	MR	Vivo > 24Mos.
22	JMM	50	10	40	10	40	30	PR	Morte sem doença 9 Mos.
27	MVR	70	28	42	12	18	10	PR	Perda para acompan hamento

Baixo	60	29	31	11	30	22
SD	12	24	16	4	10	17

Quadro I(b)

Teste cutâneo negativo NCM

29	JISM	80	80	0	10	10	0	NR	Morte por doença < 1 ano
30	AGM	80	48	32	10	10	0	NR	Morte por doença < 1 ano
35	NGS*	70	70	0	0	30	0	NR	Morte por doença < 1 ano
36	GCS*	50	15	35	10	40	40	NR	Morte por doença < 1 ano
37	MJBV*	80	16	64	16	4	0	NR	Morte por doença < 1 ano
39	FHV*	70	28	42	25	5	0	NR	Morte por doença < 1 ano

Baixo	60	29	31	11	30	22
SD	12	24	16	4	10	17

* Extraídas a partir da Experiência JUAREZ Hospital

Lisboa, 4 de Janeiro de 2012.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma mistura de citocinas naturais (NCM), incluindo as citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-gama, TNF-alfa, GM-CSF e G-CSF, para uso em imunoterapia de um paciente com cancro em um regime de dosagem compreendendo

(i) aplicação de uma quantidade da referida mistura de citocinas naturais em teste cutâneo para um paciente com cancro de tal forma que a dita aplicação mostra uma resposta clínica positiva ou negativa ao dito teste cutâneo no prazo de 24 horas, e

(ii) a administração intradérmica subsequente da referida mistura de citocinas naturais para um paciente com cancro a qual mostra a dita resposta clínica negativa para a dita aplicação na etapa (i).

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, onde 100 para 233 unidades da dita IL-2 são empregues na referida administração.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a dita administração precede a cirurgia, com ou sem radioterapia.

4. Uso de acordo com todas as reivindicações 1 a 3, onde a dita administração é junta com ciclofosfamida e indometacina.

Lisboa, 4 de Janeiro de 2012.

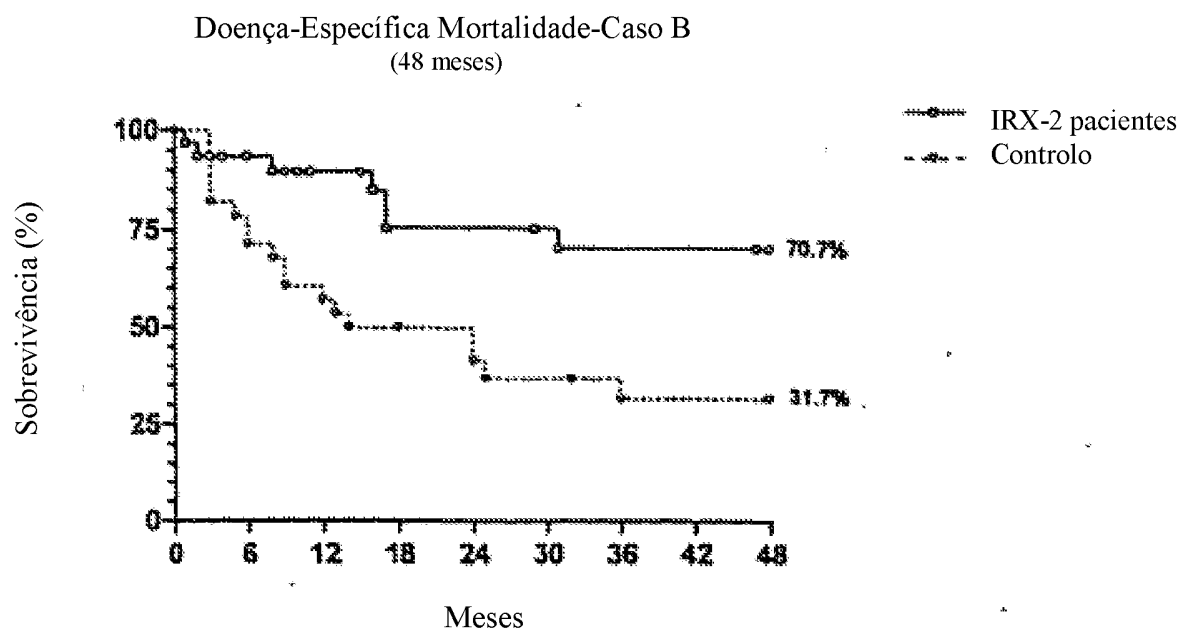


FIG.1

Doença-Específica Mortalidade- Caso A
Resposta Objectiva
(48 meses)

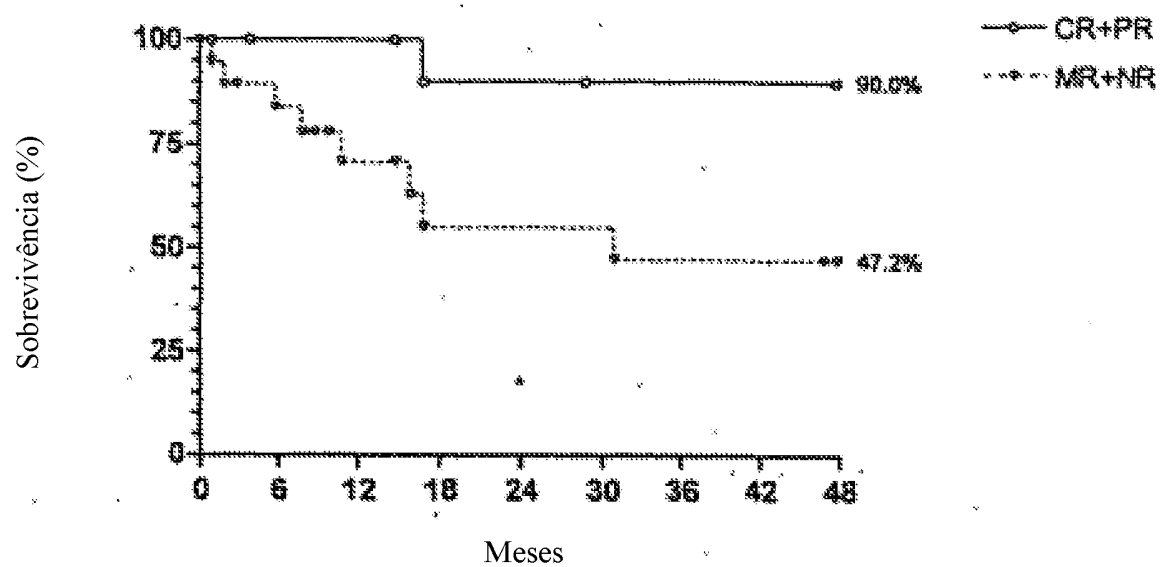


FIG.2

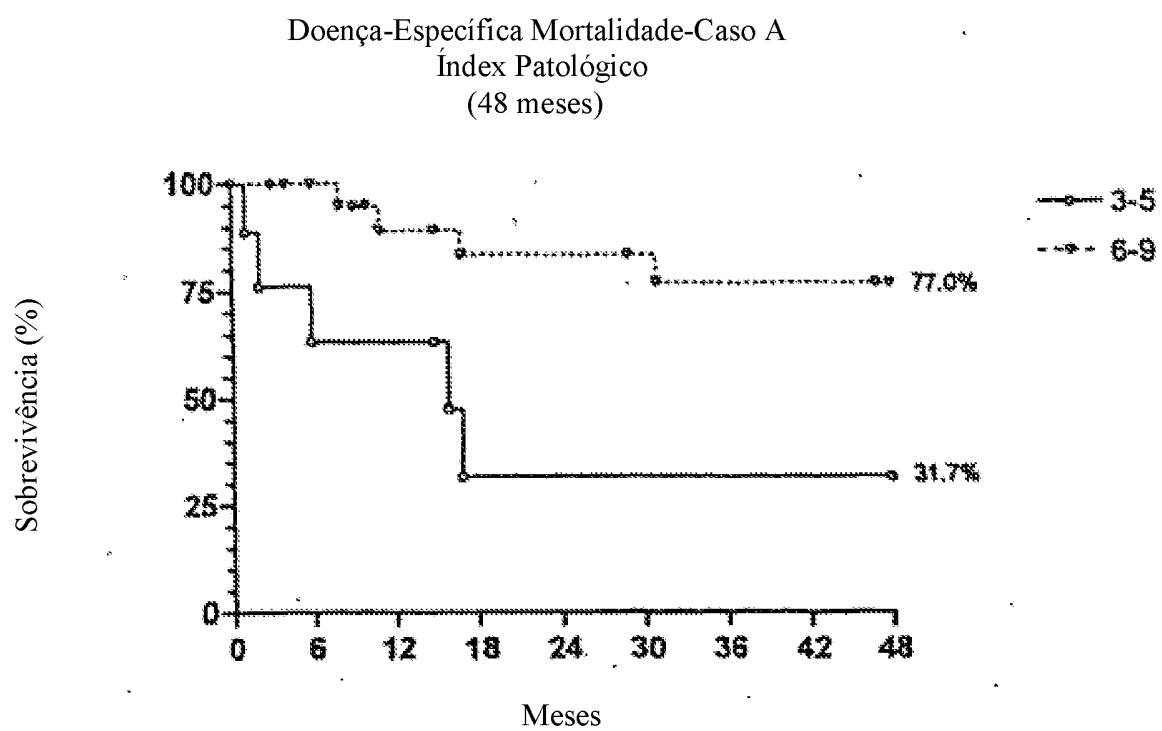


FIG. 3

Doença-Específica Mortalidade-CaseA
Infiltração Linfática
(48 meses)

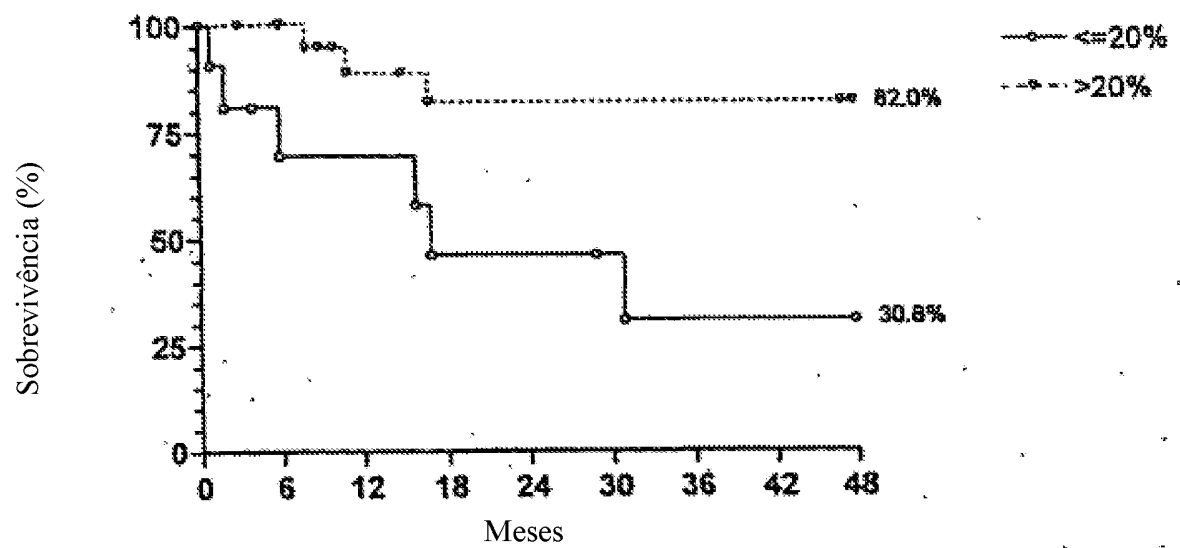


FIG. 4

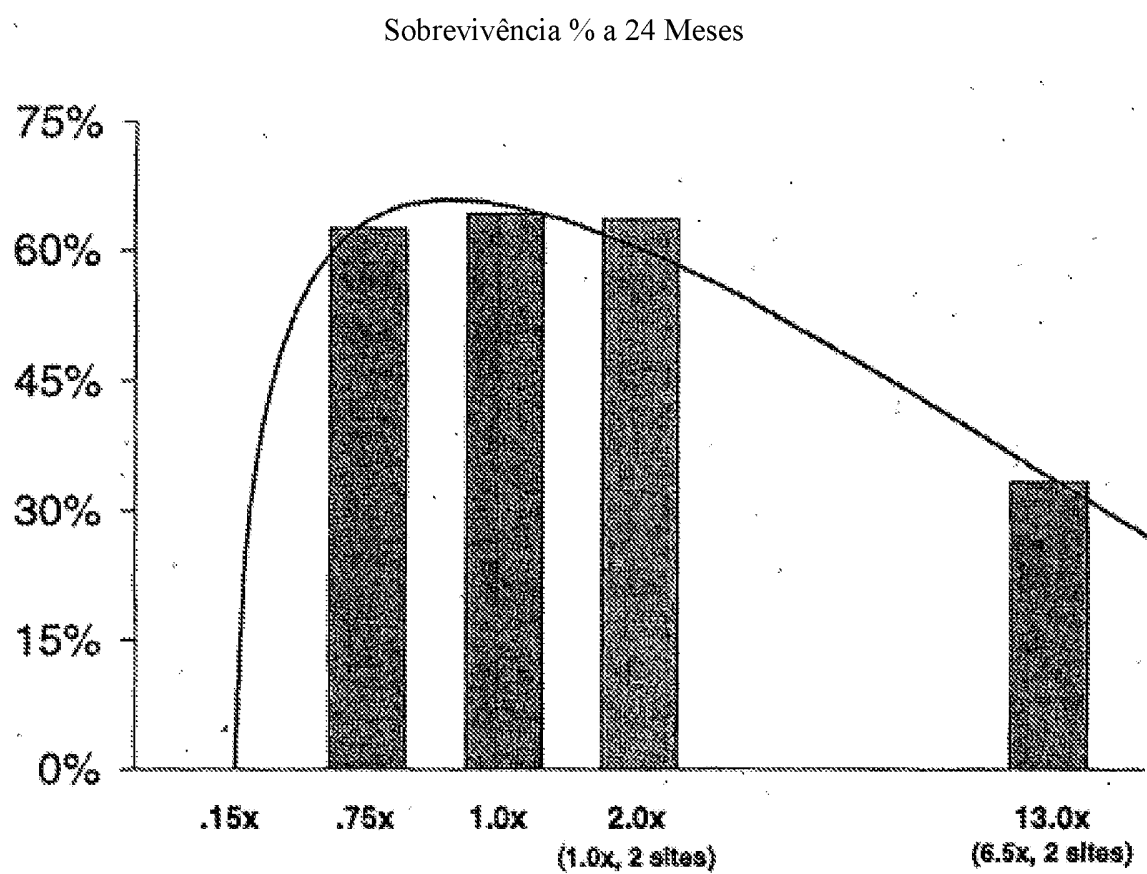


FIG. 5