

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99.123

REQUERENTE: RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION, norte-
-americana, com sede em 402 North Division
Street, Carson City, Nevada 89703, Estados
Unidos da América,

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPO-
SIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O FACTOR DE
NECROSE DE TUMOR E INTERLEUQUINA-4"

INVENTORES: Bharat Aggarwal,

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

U.S.A., 01 de Outubro de 1990, sob o Nº 07/590,977

RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION

" PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COM-
POSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O FACTOR DE
NECROSE DE TUMOR E INTERLEUQUINA-4 "

AMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a linfocinas. Em particular, refere-se aos efeitos sinérgicos do FNT e da IL-4 sobre a inibição do crescimento de células tumorais e citotoxicidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma citocina é qualquer espécie de molécula produzida por uma célula e que afecta essa célula ou outras células. Existe uma grande variedade de citocinas, as quais, como um grupo, exercem uma diversidade de efeitos sobre células tanto normais como anormais. O efeito de uma citocina específica sobre uma célula particular depende simultaneamente dessa citocina específica e do tipo de célula alvo.

O factor de necrose tumoral (FNT) é uma citocina constituída essencialmente por monocitos activados e é altamente pleiotrópico na natureza (Ayier et al., "Tumor Necrosis Factors" in CRC Handbook on Cytolytic Lymphocytes and Complement: Effectores of the Immune System (E.R. Podack, ed.), Boca Ra-

ton, Fla., CRC Press Inc., (1988) p. 105; Goeddel et al., "Tumor Necrosis Factors: Gene Structure and Biological Activities" in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (1987) 11:597). Esta citocina inibe o desenvolvimento de uma ampla diversidade de células tumorais em cultura e estimula o desenvolvimento de fibroblastos, células B e timócitos. Os efeitos citotóxicos do FNT contra as células tumorais são potenciados pelos interferões (Lee et al., J.Immunol., 133 (1984) 1003; Sugarman et al., Science, 230 (1985) 943; Aggarwal et al. Nature, 318 (1985) 665; Vilcek et al., "Interaction Between Tumor Necrosis Factor and Interferons", in The Biology of the Interferon System. (Editado por H. Schellekenes e W.E. Stewart), Amsterdão, Elsevier Science Publishers, 1986, p.249; Fransen et al. (1986) Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 22 (1986) 419-426; Campbell, et al. (1988) J. Immunol. 141:2325-2329; Schiller, et al. (1987) Cancer Res. 47:2809-2813). O aumento dos efeitos anti-proliferantes do FNT originado pelos interferões acompanha a melhoria de regulação dos receptores de FNT (Aggarwal et al., Nature 318 (1985) 665; Fransen et al. (1986) Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 22: (1986) 419-426). Contudo a melhoria de regulação dos receptores de FNT originada pelos interferões não é um mecanismo primário para a sua resposta citotóxica sinérgica (Tsujimoto et al., J. Immunol. 137 (1986) 2272-2276; Aggarwal e Eessalu, J. Biol. Chem., 262 (1987) 10000-10007).

Os efeitos sinérgicos do interferão- γ e do FNT sobre a

regulação do desenvolvimento de tumores encontram-se descritos na patente de invenção norte-americana nº 4 650 674, aqui incorporada como referência.

A interleuquina-4 (IL-4) é uma citocina imunomoduladora produzida pelos linfócitos T activados. Um dos diversos moduladores do sistema imunológico foi descrito originalmente como factor de crescimento das células B devido à sua capacidade para co-estimular a proliferação dos linfócitos B (Howard et al., J. Exp. Med., 155 (1982) 914). A IL-4 afecta também uma ampla diversidade de células incluindo as células T, as células mastóides, macrófagos e células progenitoras hematopoiéticas (Paul et al., Ann. Rev. Immunol., 5: (1987) 429; Yokota et al., Immunol. Rev., 102 (1988) 137; Crabstein et al., J. Exp. Med., 163 (1986) 1405). A IL-4 melhora o desenvolvimento de diversos tipos de células incluindo as células T e os mastócitos (Fernandez-Botran et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986) 9689; Spits et al., J. Immunol., 139 (1987) 1142; Zlotnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 (1987) 3856; Mosmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986) 5654), induz a expressão do antígeno MHC de classe II nas células B e nos monócitos (TeVelde et al., J. Immunol., 140 (1988) 1548), aumenta as células T citotóxicas específicas dos antígenos e melhora a citotoxicidade mediada pelos macrófagos (Spits et al., J. Immunol., 141 (1988) 29; Widmer et al., J. Exp. Med., 166 (1987) 1447; Crawford et al., J. Immunol., 139 (1987) 135). Embora a IL-4 desregule a produção de diversas citocinas in-

cluindo as UL-1 α , IL- β , INF- γ e FNT, melhora também a regulação da produção de IL-6 a partir das células B (Essner et al., J. Immunol., 142 (1989) 3857; Lee et al., J. of Leukocyte Biol., 47 (1990) 475-479; Pelman et al., J. Exp. Med., 170 (1989) 1751). A actividade das células LAK e NK induzida pela IL-2 é desmodulada pela IL-4 (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 74 (1988) 162; Nagler et al., J. Immunol. 141 (1988) 2349). Para além dos efeitos proliferantes da IL-4, demonstrou-se também recentemente que inibe o desenvolvimento in vitro de células linfóides humanas e de neoplasmas celulares do plasma humano (Taylor et al., Blood, 75 (1990) 5).

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos efeitos sinérgicos da IL-4 sobre a actividade anti-proliferante do FNT. A IL-4 potencia os efeitos citotóxicos do FNT contra uma diversidade de células tumorais incluindo, mas sem que isso constitua uma limitação, as células do tumor da mama, as células de carcinoma e as células de linfoma. Esses efeitos sinérgicos estão dependentes da dose de FNT e de IL-4. O reforço da citotoxicidade do FNT proporcionada pela IL-4 é comparável à que era conseguida com o interferão gama.

A presente invenção refere-se aos efeitos sinérgicos de uma citocina derivada de células T, a interleucina-4, sobre os efeitos citotóxicos do FNT em células tumorais. De acordo com um dos seus aspectos a presente invenção proporciona uma com-

posição que contém FNT e IL-4 bastante purificados. De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona uma composição que incorpora o FNT, a IL-4 e o interferão-gama (IFN- γ) substancialmente purificados. De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona a utilização dessa composição para inibir o desenvolvimento de células tumorais. Ainda de acordo com outro dos seus aspectos a presente invenção proporciona a utilização dessas composições para aniquilar células tumorais.

Os efeitos anti-proliferantes do FNT contra diversas linhas de células são potenciados pela IL-4.

A IL-4 isoladamente não possui efeitos inibidores do crescimento dessas linhas de células ou, em alguns casos, demonstrou ser ligeiramente estimuladora do crescimento. O grau do aumento dos efeitos citotóxicos do FNT proporcionado pela IL-4 é quantitativamente comparável ao do IFN- γ ; contudo, os mecanismos segundo os quais a IL-4 e o IFN- γ potenciam os efeitos anti-proliferantes ou citotóxicos do FNT e da Linfotóxina (Lt) são diferentes.

A administração de uma composição isenta de células adequada para o tratamento de células tumorais contendo factor de necrose tumoral e Interleucina-4 a um animal que tenha um tumor origina uma diminuição no desenvolvimento desse tumor. de preferência, o factor de necrose tumoral é o factor de necrose tumoral humano. O factor de necrose tumoral pode ser obtido a partir de qualquer fonte. Essas fontes são bem conhecidas pe-

los especialistas na matéria. De preferência, o factor de necrose tumoral é produzido pelo processo recombinante.

De preferência, a IL-4 é a IL-4 humana. A IL-4 pode ser obtida a partir de qualquer fonte. Essas fontes são bem conhecidas pelos especialistas na matéria. Mais preferencialmente, a IL-4 é produzida pelo método recombinante.

A presente invenção proporciona também um método para o tratamento de tumores, o qual consiste em administrar uma composição que contem FNT e IL-4 a um animal que tenha um tumor, numa quantidade que seja eficaz para tratar esse tumor.

Por outro lado a presente invenção proporciona uma composição que contém FNT, IL-4 e IFN- γ . Quando se administra uma composição da presente invenção a um animal que tenha um tumor consegue-se uma diminuição do crescimento desse tumor e simultaneamente essa composição é selectivamente citotóxica para as células tumorais.

Outros objectivos, aspectos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes através da leitura da descrição pormenorizada dos aspectos preferenciais que se segue, tomando como referência os desenhos, resumidamente descritos a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 demonstra o efeito de diferentes concentrações de FNT e de IL-4 (100 ng/ml) sobre a viabilidade das células de uma linha de células de um tumor da mama de seres humanos

(MDA-MB-330).

A Figura 2 demonstra o efeito de diferentes concentrações de FNT e de IL-4 (100 ng/ml) sobre a viabilidade das células de uma linha de células de carcinoma epitelial dos seres humanos (A-431; painel superior) e de uma linha de células de linfoma histiocítico dos seres humanos (U-937; painel inferior).

A Figura 3 demonstra o efeito de diferentes concentrações da IL-4 sobre a citotoxicidade dependente do FNT na presença de linhas de células A-431 (painel superior) e MDA-MB-330 (painel inferior).

A Figura 4 demonstra a comparação do efeito da IL-4 e do IFN- γ sobre a citotoxicidade dependente do FNT na presença de células MDA-MB-330.

A Figura 5 demonstra a comparação entre o efeito da IL-4 sobre a citotoxicidade dependente do FNT e de Lt na presença de células MDA-MB-330.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método para melhorar a actividade anti-proliferante do FNT em células tumorais mediante administração de IL-4 a essas células tumorais em concorrência como FNT. A IL-4 potencia os efeitos citotóxicos do FNT na presença de uma diversidade de células tumorais incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as células tumorais da mama (MDA-MD-330), as células do carcinoma

vulvar (A431) e as células de linfoma histiocítico (U-937). Este efeito sinérgico depende da dose de FNT e de IL-4. A IL-4 isoladamente possui um efeito mínimo sobre essas linhas de células quando administrada de per se. Na realidade, em algumas linhas de células, a IL-4 exibiu uma actividade proliferante significativa quando administrada isoladamente. O aumento da citotoxicidade do FNT originado pela IL-4 é comparável ao que foi anteriormente assinalado para o interferão gama (IFN- γ).

A presente invenção proporciona uma composição sinérgica que contém uma citocina derivada das células T, Interleucina-4 e FNT. Esta composição possui sobre as células tumorais um efeito citotóxico superior ao do FNT quando administrado isoladamente. De acordo com um dos seus aspectos a presente invenção proporciona uma composição que contém FNT e IL-4 substancialmente purificados. Estas citocinas podem ser obtidas a partir de qualquer fonte, incluindo as proteínas de origem natural ou as que são produzidas pelo método recombinante. De acordo com outro dos seus aspectos a presente invenção proporciona uma composição que contém FNT, IL-4 e interferão-gama (IFN- γ) substancialmente purificados. Ainda de acordo com outro dos seus aspectos a presente invenção proporciona a utilização dessa composição para inibir o crescimento de células tumorais. Finalmente e ainda de acordo com outro dos seus aspectos a presente invenção proporciona a utilização de composições para aniquilar células tumorais.

O termo "indivíduo" significa qualquer animal, de prefe-

rência um mamífero e mais preferencialmente um roedor, um gato, um cão, um bovino ou um ser humano.

A designação "Factor de Necrose Tumoral" aqui utilizada refere-se a um polipéptido diferente da linfotoxina susceptível de desenvolver uma actividade citotóxica preferencial e o qual possui uma região que exhibe a homologia entre os aminoácidos funcionais e a sequência de aminoácidos do factor de necrose tumoral maduro, com um seu fragmento ou com um derivado desse polipéptido ou fragmento. Existe uma descrição pormenorizada do factor de necrose tumoral útil para a prática da presente invenção, publicada na patente de invenção norte-americana nº4 650 674, aqui incorporada como referência.

A actividade citotóxica preferencial é definida como a destruição ou a inibição do crescimento preferenciais de células tumorais comparativamente com o que sucede em células normais nas mesmas condições. A actividade citotóxica preferencial é detectada pelo efeito do polipéptido sobre as células tumorais in vivo ou in vitro comparativamente com aquilo que sucede em células ou tecidos normais. A lise celular constitui geralmente indícios de diagnóstico in vitro, ao passo que a necrose tumoral é determinada em experiências efectuadas in vivo. Todavia, a actividade citotóxica pode ser manifestada sob a forma de citostase ou de actividade anti-proliferante. Os sistemas de ensaio adequados são bem conhecidos. Por exemplo, o ensaio citolítico utilizado para se determinar a actividade específica do factor de necrose tumoral adiante descrito é aceitável,

sendo também aceitável o ensaio descrito por B. Aggarwal et al., in "Thymic Hormones and Lymphokines", ed. A. Goldstein, Spring Symposion on Health Sciences, George Washinton University Medical Center, 1983 (a linha de células A549 referida na literatura indicada está disponível na ATCC com a referência CCL185).

A actividade específica do FNT é considerável em termos de lise das células alvo comparativamente com a citostase. A unidade de factor de necrose tumoral é definida como sendo a quantidade necessária para efectuar a lise de 50% das células alvo. Contudo, isto não significa que se excluam outros ensaios para a medição de actividade específica, por exemplo, os métodos com base no ritmo de crescimento das células alvo.

O factor de necrose tumoral nativo proveniente de fontes biológicas normais possui um peso molecular calculado correspondente a aproximadamente 17 000, determinado por electroforese em dodecilsulfato de sódio/gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), possui um ponto isoelétrico de aproximadamente 5,3 e uma susceptibilidade à hidrólise pela tripsina em sítios múltiplos. O factor de necrose tumoral nativo foi purificado por HPLC de fase inversa.

De uma forma geral, um polipéptido definido como factor de necrose tumoral conterá regiões substancialmente homólogas da proteína do factor de necrose tumoral descrita na patente de invenção norte-americana nº 4 650 674, ou seus fragmentos, ao longo de um bloco contínuo constituído por cerca de 20 a

100 resíduos aminoácidos, em particular os blocos que abrangem os resíduos 35-66 e 110-133.

Um factor bastante significativo para se estabelecer a identidade de um polipéptido como factor de necrose tumoral é a capacidade anti-sérica, susceptível de neutralizar substancialmente a actividade citolítica do factor de necrose tumoral, para neutralizar também substancialmente a actividade citolítica do polipéptido em questão. Todavia, deve notar-se que a identidade imunológica e a identidade citotóxica não são necessariamente co-extensivos. Um anticorpo neutralizador para o factor de necrose tumoral pode não se ligar a uma proteína candidata, uma vez que esse anticorpo neutralizador pode não ser dirigido para se ligar especificamente a um sítio num factor de necrose tumoral que seja crítico para a sua actividade citotóxica. Em vez disso, o anticorpo pode ligar-se a uma região inócua e exercer o seu efeito neutralizador por obstrução espacial. Em consequência, uma proteína candidata mutada nesta região inócua pode já não se ligar ao anticorpo neutralizador mas será ainda assim factor de necrose tumoral em termos de homologia substancial e actividade biológica.

É importante observar que características tais como o peso molecular, o ponto isoeléctrico e semelhantes para o factor de necrose tumoral humano maduro de tipo nativo ou de tipo selvagem obtido a partir de culturas de linfócitos periféricos ou de linhas de células estabelecidas, são descritivas apenas para as espécies nativas do factor de necrose tumoral. O fac-

tor de necrose tumoral, tal como enquadrado pela definição anterior, englobará outras espécies que não exibirão eventualmente todas as características do factor de necrose tumoral nativo. Embora o factor de necrose tumoral aqui definido englobe o factor de necrose tumoral nativo, outros polipéptidos citotóxicos afins consideram-se englobados no âmbito da definição. Por exemplo, os derivados de FNT, tais como os mutantes por inserção, os mutantes por supressão ou as proteínas de fusão, farão com que o factor de necrose tumoral apresente um peso molecular fora dos limites estabelecidos para o factor de necrose tumoral humano nativo (as proteínas de fusão com factor de necrose tumoral maduro ou com o próprio pré-FNT e também os mutantes por inserção possuirão um peso molecular superior ao do factor de necrose tumoral maduro nativo, ao passo que os mutantes por supressão do factor de necrose tumoral maduro nativo possuirão um peso molecular inferior). De modo semelhante, o factor de necrose tumoral pode ser projectado e concebido com o objectivo de reduzir ou eliminar a susceptibilidade à hidrólise pela tripsina ou por outras proteases. Finalmente, o processamento pós-traducional do pré-FNT humano em linhas de células derivadas de mamíferos não primatas pode eventualmente produzir micro-heterogeneidade na região amino-terminal, pelo que poderá suceder que a valina deixe de ser o aminoácido terminal.

Deve notar-se que o termo "susceptível" de actividade ci-

totóxico ou necrose tumoral in vivo significa que a designação "factor de necrose tumoral" abrange os polipéptidos que podem ser convertidos, por exemplo, por hidrólise enzimática, a partir de um estado inactivo análogo ao de um zimogénio para proporcionar um fragmento polipeptídico que exiba a desejada actividade biológica. Tipicamente, os precursores inactivos serão proteínas de fusão nas quais o factor de necrose tumoral maduro está ligado por uma ligação peptídica existente no seu terminal carboxilo, a uma proteína humana ou a um correspondente fragmento". A sequência nesta ligação peptídica, ou próximo, é seleccionada de modo a que seja susceptível à hidrólise proteolítica para libertar o factor de necrose tumoral, eventualmente in vivo, ou, como parte de um protocolo de preparação, in vitro. O factor de necrose tumoral assim originado exhibirá a actividade citotóxica necessária de acordo com a definição.

Embora " factor de necrose tumoral" signifique vulgarmente " factor de necrose tumoral humano", qualquer factor de necrose tumoral proveniente de fontes tais como os murinos, suínos, equínos ou bovinos está englobado no âmbito da definição de factor de necrose tumoral, na medida em que satisfaça os critérios anteriormente descritos relativos a regiões homólogas e a actividade citotóxica. O FNT não é específico das espécies, por exemplo, o FNT humano é activo em tumores de murinhos. Em consequência, o FNT de uma espécie pode ser utilizado na terapia de outra espécie.

O factor de necrose tumoral engloba também formas multi-méricas. Os derivados de factor de necrose tumoral consideram-

-se englobados no âmbito da definição do "factor de necrose tumoral". As regiões da molécula de necrose tumoral compreendidas entre os resíduos 35 a 66 e 110 a 133 inclusivé demonstram uma homologia substancial (50%) com a linfotoxina. Os terminais carboxi hidrófobios (resíduos 150 a 157 do factor de necrose tumoral) das duas moléculas também são significativamente conservados. Uma vez que ambas as proteínas demonstram actividade citotóxica ou necrose tumoral in vivo, admite-se que essas regiões sejam importantes na actividade partilhada da linfotoxina e do factor de necrose tumoral. Em consequência, na prática da presente invenção, é possível substituir a linfotoxina numa composição da presente invenção, utilizando-a em vez do FNT.

O termo " Interleucina-4" ou "IL-4" aqui utilizado refere-se a um polipéptido originalmente descrito como um factor produzido pelas células do timoma EL-4 após activação pelo TPA, o qual induz a proliferação de células B dos murinos activadas por doses submitogénicas de anti-Ig. A IL-4 também foi designada por Factor de Crescimento das Células B (FCCB), Factor Estimulador das Células B (FEB-1), Factor II do Crescimento das Células T (FCCT-II) e Factor-II de Crescimento das Células Mastóides (FCCM-II) (Howard et al., J.Exp. Med., 155 (1982) 914-923; Yokota et al., Immunol. Rev. 102 (1988) 137). A IL-4, produzida por uma diversidade de populações de linfócitos/células T, pode ser detectada por ensaios imunológicos (ELISA) e através da análise das manchas de Northern (Paliard

et al., (1988)). Tipicamente é possível determinar a actividade da IL-4 num bioensaio da actividade promotora do crescimento das células T tal como o descrito por Spits et al. J. Immunol. 139 (1987) 1142-1147. Contudo, os especialistas na matéria conhecem outros métodos para ensaiar a actividade e para identificar a IL-4. Por exemplo, realiza-se um bioensaio típico activando as células mononucleares do sangue periférico com PHA durante 72 horas à temperatura de 37°C, lavando os PHA-blastos e colocando em placa 5 000 células/0,1 ml/cavidade numa placa de 96 cavidades. As amostras de ensaio da IL-4 são diluídas em série e incubadas com as células durante 72 horas à temperatura de 37°C. Adiciona-se às células timidina triciada e determina-se a actividade de IL-4 medindo a incorporação de timidina triciada nessas células. Define-se uma unidade de IL-4 como sendo a quantidade de citocina que proporciona metade da proliferação máxima.

A purificação de IL-4 de ocorrência natural a partir de sobrenadantes de uma cultura contendo soro foi descrita por Le et al., J. Biol. Chem., 263 (1988) 10817-10823. Resumidamente, após cromatografia de permuta catiónica em S-Sepharose, procede-se à eluição das fracções que contêm a IL-4 utilizando um gradiente de NaCl variável entre 0 e 0,5M em HEPES 50 mM, pH 7,0, e a seguir efectua-se a filtração de gel em Sephadex G-100. As fracções contendo a IL-4 são ainda purificadas por HPLC de fase inversa, utilizando um gradiente variável entre 20% e 70% (v/v) de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a

0,1% (v/v).

Estes procedimentos permitem a recuperação de aproximadamente 60% e uma purificação correspondente a 3 000 vezes (actividade específica; $2,6 \times 10^7$ U/mg). A purificação da IL-4 a partir de sobrenadantes de uma cultura isenta de soro exige apenas um passo de cromatografia em CM-Sepharose permitindo uma recuperação de 40% e uma purificação de 100 vezes (actividade específica: 3×10^7 U/mg).

Qualquer polipéptido que possua uma actividade de IL-4 e que possua uma região que demonstre possuir homologia entre os aminoácidos funcionais e a sequência de aminoácidos da IL-4 madura, ou com um seu fragmento ou um derivado desse polipéptido ou desse fragmento, é útil na prática da presente invenção.

A actividade específica da IL-4 é notável em termos de proliferação celular, pese embora o facto de a sua utilização na presente invenção consistir na potenciação da citotoxicidade do FNT. Contudo, isto não significa a exclusão de outros ensaios para a medição da actividade específica, por exemplo, os métodos que têm como base outros efeitos biológicos sobre células alvo.

As propriedades fisico-químicas da IL-4 foram descritas por Yokota et al., Immunol. Rev., 102 (1988) 137 e Le et al., J.Biol. Chem., 263 (1988) 10817-10823. A IL-4 nativa proveniente de fontes biológicas normais possui um peso molecular calculado compreendido aproximadamente entre 20 000 e 22 000

Da, tal como determinado por filtração em gel, possui um ponto isoelétrico de aproximadamente 6,7 no caso de os grupos de açúcar terem sido removidos e um ponto isoelétrico de aproximadamente 10,53 na presença dos grupos açúcar e é susceptível à hidrólise pela tripsina e pela quimotripsina. A sequência da proteína IL-4 possui 129 aminoácidos, o que origina um peso molecular teórico correspondente a 15 000 dalton. Este peso molecular teórico é próximo do valor dos pesos moleculares determinados por SDS-PAGE correspondentes a 15 000, 18 000 e 19 000

A discrepância entre o peso molecular determinado por filtração em gel e por SDS-PAGE é devida aos radicais dos hidratos de carbono.

A IL-4 recombinante possui um peso molecular calculado de aproximadamente 22 000 Da determinado por filtração em gel e de 15 000 determinado por SDS-PAGE, possui um ponto isoelétrico de aproximadamente 10,53 e é susceptível à hidrólise pela tripsina e pela quimotripsina.

É estável durante mais de 3 meses à temperatura de 4°C, é estável durante mais de 1 mês à temperatura ambiente e é estável durante aproximadamente 10 minutos à temperatura de 56°C. A IL-4 é estável num grande intervalo de valores de pH (2-10). A IL-4 não é específica das espécies, uma vez que a IL-4 de origem humana actua sobre as células dos murinos, mas a IL-4 dos murinos é específica da espécie.

O grau de homologia da sequência dos aminoácidos que faz com que um polipéptido seja considerado no âmbito da definição

da IL-4 aqui apresentada, variará consoante a homologia entre a proteína candidata e a IL-4 estiver compreendida ou excluída das regiões da IL-4 responsáveis pela actividade citotóxica. Os domínios que são críticos para a actividade citotóxica devem exibir um grau elevado de homologia no sentido de estarem abrangidos no âmbito da definição, ao passo que as sequências que não estão envolvidas na manutenção da conformação da IL-4 ou não contribuem para efectuar a ligação ao receptor podem exibir uma homologia comparativamente baixa. Além disso, os domínios críticos podem exibir actividade citolítica e mesmo assim continuarem homólogos, de acordo com a definição aqui apresentada, se os resíduos que contêm cadeias secundárias de aminoácidos funcionalmente semelhantes forem substituídos. A designação " funcionalmente semelhante " refere-se às características dominantes das cadeias laterais tais como as características básica, neutra ou ácida, ou ainda a presença ou a ausência de uma massa volumosa.

Um dos factores mais significativos para o estabelecimento da identidade de um polipéptido identificando-o como IL-4 reside na capacidade do anti-soro, o qual é capaz de neutralizar bastante bem a actividade biológica da IL-4, para também neutralizar substancialmente a actividade biológica do polipéptido em questão. Contudo, deve notar-se que a identidade imunológica e a identidade citotóxica não são necessariamente co-extensivas. O anticorpo neutralizador para a IL-4 pode não se ligar a uma proteína candidata, uma vez que pode suceder

que o anticorpo neutralizador não esteja dirigido para se ligar especificamente a um sítio na IL-4 que seja crítico para a sua actividade biológica. Em vez disso, o anticorpo pode ligar-se a uma região inócua e exercer o seu efeito neutralizador por obstrução espacial. Em consequência, uma proteína candidata mutada nesta região inócua pode já não se ligar ao anticorpo neutralizador, mas apesar disso continuará a ser uma IL-4 em termos de homologia substancial e actividade biológica.

É importante observar que as características tais como o peso molecular, o ponto isoeléctrico e semelhantes para a IL-4 madura de tipo nativo ou selvagem, obtida a partir de culturas de linfócitos periféricos ou de linhas de células estabelecidas, são descritivas apenas para as espécies nativas da IL-4. A IL-4, contemplada pela definição anterior, inclui outras espécies que não exibam todas as características da IL-4 nativa. Considerando que a IL-4 agora definida abrange a IL-4 nativa, outros polipéptidos afins são também abrangidos pela definição. Por exemplo, os derivados de IL-4 tais como os mutantes por inserção, os mutantes por supressão ou as proteínas de fusão fazem com que a IL-4 esteja fora dos limites de peso molecular estabelecidos para a IL-4 nativa (as proteínas de fusão com IL-4 madura e também os mutantes por inserção possuirão um peso molecular superior ao da IL-4 madura nativa, ao passo que os mutantes por supressão da IL-4 nativa possuirão um peso molecular inferior). De modo semelhante, a IL-4 pode ser projectada e concebida com o objectivo de se reduzir ou eliminar a

susceptibilidade à hidrólise pela tripsina ou por outros proteases.

A composição da presente invenção pode ser administrada com qualquer um ou com todos os polipéptidos numa forma inactiva que possa ser convertida, por exemplo, por hidrólise enzimática, a partir de um estado inactivo análogo ao de um zimogénio, num fragmento polipéptídico que exiba a desejada actividade biológica. Tipicamente, os precursores inactivos serão proteínas de fusão nas quais um ou mais dos produtos IL-4, FNT e/ou IFN- γ seja ligado por uma ligação peptídica existente no seu terminal carboxilo a uma proteína humana ou a um seu fragmento ou, em alternativa, directa ou indirectamente a outro dos polipéptidos utilizáveis na prática da presente invenção. A sequência nesta ligação peptídica ou próximo dela é seleccionada de modo a ser susceptível à hidrólise proteolítica para libertar a IL-4, o factor de necrose tumoral e o IFN- γ , eventualmente in vivo ou, como parte de um protocolo de preparação in vitro. A composição assim obtida exhibirá a actividade citotóxica necessária de acordo com a definição.

Embora "IL-4" signifique vulgarmente IL-4 de origem humana, a IL-4 proveniente de outras fontes tais como murinos, suínos, equínos ou bovinos considera-se abrangida pela definição de IL-4, na medida em que satisfaça às características anteriormente descritas no que diz respeito a regiões homólogas e a actividade citotóxica.

As formas multiméricas da IL-4 também podem ser utiliza-

das na prática da presente invenção.

Os derivados de IL-4 consideram-se englobados no âmbito do termo "IL-4". Esses derivados englobam mutantes da sequência de aminoácidos, variantes de glicosilação e conjugados covalentes ou agregantes com outros radicais químicos. Os derivados covalentes preparados por acoplamento de funcionalidades aos grupos que se encontram nas cadeias laterais de aminoácidos da IL-4 ou nos terminais N ou C, recorrendo a métodos conhecidos na especialidade.

Tal como sucede com o FNT, os derivados de IL-4 mutante abrangem as mutações da IL-4 pré-determinadas, isto é, específicas do sítio, ou seus fragmentos utilizáveis na prática da presente invenção. A IL-4 mutante define-se como sendo um polipéptido que de alguma forma é abrangido pela definição de homologia para a IL-4 aqui apresentada, mas o qual possui uma sequência de aminoácidos diferente da que corresponde à IL-4, quer isso ocorra por supressão, por substituição ou por inserção. As técnicas para realizar mutações de substituição em sítio pré-determinados no ADN que possui uma sequência conhecida, são bem conhecidas, por exemplo, a técnica da mutagenese do iniciador M13.

A designação "factor de necrose tumoral ou IL-4 substancialmente homogêneos" significa factor de necrose tumoral ou IL-4 que estão substancialmente isentos de outras proteínas nativas em relação à fonte a partir da qual foi isolada a proteína nativa. Significa isto que o factor de necrose tumoral

e/ou a IL-4 homogêneos são praticamente isentos de proteínas do plasma sanguíneo, tais como a albumina, fibrinogênio, proteases da serina, α -globulinas, polipéptidos citotóxicos de factor de necrose não tumoral, tais como as linfotoxinas ou os interferões, ou outras proteínas das células ou do organismo que sirvam como origem de síntese do polipéptido, incluindo células inteiras e fragmentos celulares em pequenas partículas. Todavia, os polipéptidos substancialmente puros podem conter substâncias tais como os estabilizadores e os excipientes adiante descritos, quantidades pré-determinadas de proteínas provenientes de células ou de organismos que serviram como origem para a síntese, proteínas provenientes de outras fontes polipeptídicas diferentes das células ou dos organismos originais, e ainda polipéptidos de síntese, tais como a poli-L-lisina. O factor de necrose tumoral ou a IL-4 recombinante que se expressam em células hospedeiras alogénicas, por exemplo, de tipo bacteriano, serão evidentemente expressados completamente isentos de proteínas de origem génica.

A IL-4 e o factor de necrose tumoral utilizados na prática da presente invenção são sintetizados preferencialmente em culturas de organismos recombinantes utilizando meios conhecidos pelos especialistas na matéria.

Prepara-se uma composição de acordo com a presente invenção, adequada para administração, misturando o factor de necrose tumoral e IL-4 tendo o grau de pureza desejado, com veículos fisiologicamente aceitáveis, isto é, veículos que não

sejam tóxicos para os pacientes nas dosagens e nas concentrações utilizadas. Normalmente realiza-se este objectivo combinando a composição de IL-4 e de FNT da presente invenção com tampões, anti-oxidantes, tais como o ácido ascórbico, polipéptidos de baixo peso molecular (com menos de 10 resíduos aproximadamente), proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono incluindo a glúcase ou as dextrinas, agentes quelantes, tais como EDTA e outros estabilizadores e excipientes. O veículo deve ser formulado de modo a estabilizar a composição. A composição destinada a ser utilizada para administração terapêutica deve ser estéril. Isto realiza-se facilmente por filtração através de membranas filtrantes estéreis. A composição será normalmente armazenada sob uma forma liofilizada.

Além disso, uma vez que os interferões actuam sinergicamente com a IL-4 e com o factor de necrose tumoral, combina-se vantajosamente qualquer dos interferões alfa, beta ou gama com composições de IL-4/ factor de necrose tumoral ou com composições que contenham IL-4/factor de necrose tumoral e ainda linfotoxina. O FNT possui uma actividade específica de aproximadamente 100 U/mg. A actividade específica da IL-4 e do IFN- γ é de aproximadamente 10 U/mg. Uma formulação típica contém IL-4 e/ou IFN e factor de necrose tumoral e/ou linfotoxina numa relação para uma actividade unitária, compreendida aproximadamente entre 0,1:1 e 200:1, normalmente entre 10 e 1, e pode conter linfotoxina em vez de conter uma parte ou todo o factor de necrose tumoral. Como é evidente essas proporções

estão sujeitas a modificações conforme determinado pela experiência terapêutica.

As composições de IL-4/FNT são administradas aos animais que tenham tumores. A via de administração está de acordo com os métodos conhecidos, por exemplo, as vias intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, perfusão intralesional ou injeção de soluções estéreis de IL-4/FNT, ou ainda através de sistemas de libertação controlada, conforme se descreve adiante. As composições de IL-4/FNT podem ser administradas intralesionalmente, isto é, por injeção directa nos próprios tumores sólidos. No caso de tumores disseminados, tais como a leucemia, a administração far-se-á preferencialmente por via intravenosa ou através do sistema linfático. Os tumores dos órgãos abdominais, tais como o cancro dos ovários, são tratados vantajosamente por perfusão intraperitoneal utilizando equipamento de diálise peritoneal e soluções compatíveis sob o ponto de vista peritoneal. Contudo, as composições de IL-4/FNT são normalmente administradas de forma contínua por perfusão, embora sejam aceitáveis as injeções em ampôlas.

A composição de IL-4/FNT é administrada desejavelmente a partir de um dispositivo implantável de libertação controlada. Como exemplos de sistemas adequados para proteínas que têm o peso molecular dos dímeros ou trímeros do factor de necrose tumoral refere-se os copolímeros de ácidos L-glutâmico e do etil-L-glutamato gama (U. Sidman et al., Biopolymers, 22 (1) (1983) 547-556), poli-(2-hidroxi-etil-metacrilato) (R. Langer

et al., J. Biomed. Matter. Res. 15 (1981) 167-277 e R. Langer Chem. Tech. 12 (1982) 98-105) ou vinil-acetato de etileno (R. Langer et al. id). Este dispositivo é implantado cirurgicamente nos sítios de onde devem ser excisados os tumores. Em alternativa, a composição de IL-4/FNT é encapsulada em microcápsulas semi-permeáveis ou lipossomas para injeção no interior do tumor. Este modo de administração é particularmente útil no caso dos tumores inexcisáveis cirurgicamente, por exemplo, tumores do cérebro.

O método de tratamento das células tumorais, de acordo com a presente invenção, por administração de FNT e de IL-4 a indivíduos que tenham tumores contempla simultaneamente a administração concorrente e sequencial desses polipéptidos. Como é do conhecimento dos especialistas na matéria, o efeito da administração concorrente será simulado pela administração ao indivíduo de um qualquer desses polipéptidos seguindo-se a administração subsequente do segundo polipéptido. A distribuição temporal dessa administração sequencial é evidente para os especialistas na matéria e depende unicamente da velocidade de degradação in vivo do primeiro polipéptido administrado.

A quantidade de composição de IL-4/FNT que é administrada dependerá, por exemplo, da via de administração, do tumor em questão e do estado de saúde do paciente. As injeções intralesionais necessitarão de menos quantidade de IL-4/FNT, tomando como base a massa do corpo, do que a infusão intravenosa, ainda que alguns tipos de tumor, por exemplo, os tumores sólidos parecem

ser mais resistentes ao factor de necrose tumoral do que outros, por exemplo, os de natureza leucémica. Em consequência, será necessário que o terapeuta proceda à titulação da dosagem e modifique a via de administração conforme for necessário para se obter uma actividade citotóxica óptima dirigida ao tumor alvo, podendo isto ser determinado, por exemplo, por biópsia do tumor ou por ensaios de diagnóstico para marcadores de cancro putativo, tais como o antígeno carcinoembrionico, tendo em consideração qualquer toxicidade recombinante que venha a ser encontrada para dosagens elevadas. De uma forma geral tem sido verificado que as dosagens de factor de necrose tumoral em murganhos (até cerca de 120 microgramas/kg de massa do corpo/dia por administração intravenosa) são substancialmente não tóxicas e eficazes in vivo. Verificou-se também que as dosagens de IL-4 em murganhos (até cerca de 120 microgramas/Kg de massa do corpo/dia por administração intravenosa) são substancialmente não tóxicas e eficazes in vivo.

Admite-se que o factor de necrose tumoral não seja específico das espécies no que diz respeito à sua actividade citotóxica pelo que os factores de necrose tumoral diferentes do factor de necrose tumoral humano, por exemplo, proveniente de fontes derivadas de bovinos ou de suínos, podem ser utilizados na composição da presente invenção em terapia de tumores humanos. Contudo, é desejável utilizar o factor de necrose tumoral proveniente da espécie que se pretende tratar, com objectivo de evitar a geração potencial de auto-anticorpos.

Todas as citações relativas à literatura são expressamente incorporadas como referência.

Acabada de descrever genericamente a presente invenção, pode ter-se um conhecimento mais completo tomando como referência exemplos específicos que se seguem. Esses exemplos têm objectivos ilustrativos e não devem ser considerados como limitativos, salvo quando especificado de outro modo.

EXEMPLO 1

Procedimentos para as Culturas Celulares

Todas as linhas de células foram estritamente mantidas em culturas subconfluentes. As células foram distribuídas por placas de Petri, a concentrações compreendidas entre 0,3 e 1,3 x 10⁶ células/ placa de Petri de 25 mm em meio DMEM enriquecido com glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e soro de bovino fetal (10%) numa incubadora humidificadora sob uma atmosfera de ar contendo 5% de CO₂.

EXEMPLO 2

Ensaaios de Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade distribuiu-se 5 x 10³ células em 0,1 ml de meio, por placas Costar com 96 cavidades. Após incubação nocturna à temperatura de 37°C em atmosfera humidificada de ar contendo 5% de CO₂, removeu-se o meio e pre-

parou-se uma diluição em série da amostra de ensaio em 0,1 ml de meio. Decorridas 72 horas de incubação à temperatura de 37°C removeu-se o meio e procedeu-se à verificação das células viáveis por coloração violeta cristal, conforme descrito por Suggarman et al., Science, 230 (1985) 943. Calculou-se a percentagem de viabilidade celular relativa dividindo a densidade óptica na presença da amostra de ensaio pelo valor da densidade óptica na ausência da amostra de ensaio (meio) e multiplicando por 100.

EXEMPLO 3

Ensaio Radiorreceptor

Os ensaios de ligação ao receptor foram efectuados conforme descrito por Aggarwal et al Nature, 318 (1985) 665. Resumidamente, procedeu-se à incubação de $0,25 \times 10^6$ células em tubos de polipropileno com as dimensões de 12 x 75 mm contendo 0,2 ml de meio recente arrefecido com gelo (DMEM + 10% de FBS) e contendo também $0,2 \times 10^6$ cpm de ^{125}I -FNT, tanto na presença (ligação não específica) como na ausência (ligação total) de um excesso de 100 vezes de FNT não marcado. Decorridos 60 minutos de incubação à temperatura de 4°C, removeu-se o meio, lavou-se as células três vezes por centrifugação e determinou-se a radioactividade ligada às células. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

EXEMPLO 4

Reforço do Efeito Anti-proliferante do FNT

Proporcionado pela IL-4

Verificou-se que a interleucina-4 reforçava os efeitos anti-proliferantes do FNT quando testada na presença de tipos diferentes de células tumorais. Utilizando concentrações variáveis de FNT isoladamente ou em associação com uma concentração fixa de IL-4 (100 ng/ml) procedeu-se ao exame da sua acção sobre uma linha de células tumorais da mama MDA-MB 330. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 1. Após incubação de 5×10^3 células em 0,1 ml de meio contendo a quantidade indicada das citocinas durante 72 horas, determinou-se a viabilidade das células conforme descrito no Exemplo 1. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

O FNT sozinho, mesmo em concentrações da ordem de 10 000 U/ml, tem um efeito mínimo sobre essas células. Todavia, quando se adiciona a IL-4 a culturas com o FNT, o crescimento dessas células é inibido em conformidade com a dose. Conforme se pode concluir da Figura 1, apenas se observou 10% de inibição do desenvolvimento celular para a concentração de 10 000 U/ml. Todavia, ao adicionar-se também 100 ng/ml de IL-4, a inibição do desenvolvimento das células tumorais aumentou até quase 60%. Também se observou a potenciação dos efeitos citotóxicos do FNT devido à IL-4 com outros tipos de células, tais como as células do carcinoma vulvar (A431) e as células do linfoma

histiocítico (U-937). A Figura 2 demonstra o efeito de concentrações diferentes de FNT e de IL-4 (100 ng/ml) sobre a viabilidade celular relativa (em percentagem) da linha de células do carcinoma epitelial humano (A-431); painel superior) e da linha de células do linfoma histiocítico humano (U-937; painel inferior). Efectuou-se a incubação de $0,5 \times 10^3$ células em 0,1 ml de meio contendo a quantidade indicada das citocinas durante 72 horas e posteriormente determinou-se a viabilidade das células conforme descrito no Exemplo 1.

A Figura 2 demonstra que é possível observar um efeito significativo da IL-4 sobre a modulação do crescimento das células A431 (painel superior) dependente do FNT, para concentrações da citocina da ordem de 0,01 U/ml.

O reforço dos efeitos citotóxicos do FNT originado pela IL-4 foi ainda mais pronunciado sobre as células U-937 (painel inferior) para um valor superior da concentração (1000 U/ml).

Investigou-se também o efeito de concentrações variáveis de IL-4 sobre uma concentração fixa de FNT (1000 U/ml). Proce-
deu-se à incubação de 5×10^3 células com as concentrações indicadas das citocinas em 0,1 ml de meio durante 72 horas e posteriormente determinou-se a viabilidade das células conforme indicado no Exemplo 1. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado. A Figura 3 demonstra o efeito de concentrações variáveis de IL-4 sobre a citotoxicidade de 1000 unidades/ml de FNT contra linhas de células A-431 (painel superior) e MDA-MB-330 (painel inferior). Apresenta-se também o

efeito de uma dose única de IL-4 (1 µg/ml). As células A-431 (painel superior) foram inibidas de um modo dependente da dose na presença simultaneamente de IL-4 e FNT. A IL-4 sozinha foi ineficaz mesmo para uma concentração de 1 µg/ml. Observou-se uma resposta similar dependente da dose da IL-4 com células tumorais da mama (painel inferior).

EXEMPLO 5

Comparação da Potenciação da Citotoxicidade do FNT na Presença de IL-4 e IFN- γ

Demonstrou-se previamente que o interferão- γ aumenta também os efeitos citotóxicos do FNT contra uma grande variedade de linhas de células tumorais (patente de invenção norte-americana nº 4 650 674; Lee et al., J. Immunol. 133 (1984) 1003; Sugarman et al., Science, 230 (1985) 943; Aggarwal et al., Nature, 318 (1985) 665; Vilcek et al., "Interaction Between Tumor Necrosis Factor and Interferons" in The Biology of the Interferon System, Editado por H. Schellekenes e W.E. Stewart, Amesterdão Elsevier Science Publishers, 1986 p. 249; Fransen et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 22 (1988) 419-426; Campbell et al., J. Immunol., 141 (1988) 2325-2329; Schiller et al., Cancer Res., 47 (1987) 2809-2813; Tsujimoto et al., J. Immunol., 137 (1986) 2272-2276). Na Figura 4 compara-se o efeito da IL-4 e do IFN- γ sobre a citotoxicidade dependente do FNT contra células MDA-MB-330. Procedeu-se à incu-

bação de 5×10^3 células em 0,1 ml de meio contendo concentrações diferentes de FNT e alternativamente IL-4 (100 ng/ml) ou IFN- γ (100 ng/ml) durante 72 horas e posteriormente determinou-se a viabilidade das células conforme descrito no Exemplo 1. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

Com o objectivo de determinar se a IL-4 e o IFN- γ actuam segundo mecanismos semelhantes para potenciar os efeitos citotóxicos do FNT comparou-se a potenciação da resposta anti-proliferante do FNT na presença de IL-4 e na presença de interferão- γ . Os resultados apresentados na Figura 4 indicam que no caso das células tumorais da mama tanto a IL-4 como o IFN- γ , para valores iguais de concentração (100 ng/ml), aumentam de forma similar os efeitos do FNT inibidores do crescimento. Observou-se uma inibição do desenvolvimento celular de aproximadamente 60 a 70%. Foram obtidos resultados similares com as células A-431 e U-937 (Quadro 1).

QUADRO 1

Efeitos da Interleucina-4 e do Interferão Gama sobre os Efeitos Anti-proliferantes Dependentes do FNT contra Diversas Linhas de Células de Tumores Humanos¹

<u>Citocina</u>	<u>Viabilidade Celular Relativa (Porcentagem)</u>		
	<u>MDA-MB-330</u>	<u>A-431</u>	<u>U-937</u>
nenhuma	100	100	100
FNT	80	71	89
IL-4	103	86	104
IFN-g	82	69	104
FNT+IFN-g	42	33	50
FNT+IL-4	51	45	64
IFN-g + IL-4	60	48	89
FNT+IFN-g+IL-4	38	20	41

- 1) Procedeu-se à incubação de 5×10^3 células em 0,1 ml de meio contendo alternativamente FNT (200 ng/ml) ou IL-4 (100 ng/ml) ou IFN- γ (100 ng/ml) ou uma associação de citocinas, conforme indicado antes. No caso das células A-431 a concentração de todas as citocinas foi idêntica excepto no caso do IFN- γ (1 ng/ml). Decorridas 72 horas de incubação com as citocinas, determinou-se a viabilidade das células pelo processo da coloração com violeta de

cristal, conforme indicado no Exemplo 1.

Admite-se que a IL-4 aumente ligeiramente os efeitos anti-proliferantes do IFN- γ , embora isso não ocorra com intensidade idêntica à do FNT (Quadro 1). Adicionalmente verificou-se que uma associação das três citocinas demonstrou maximizar a eficácia. Por exemplo, ao efectuar-se um teste sobre células A431, observou-se apenas 30% de inibição do desenvolvimento celular com o FNT, 55% quando se adicionou conjuntamente a IL-4 e o FNT e ainda 80% quando as três citocinas estiveram presentes numa associação, isto é, quando estiveram presentes IFN- γ , IL-4 e FNT (Quadro 1).

Estes resultados indicam que o mecanismo pelo qual o IFN- γ aumenta a resposta citotóxica do FNT é diferente do mecanismo correspondente à IL-4. Com o objectivo de demonstrar melhor a diferença no mecanismo de potenciação do FNT proporcionada pela IL-4 e pelo IFN- γ , determinou-se o efeito das duas citocinas sobre a indução do receptor do FNT. Sabe-se que o IFN- γ induz o receptor para o FNT. Os resultados apresentados no Quadro II indicam claramente que a pré-exposição das células U-937 à IL-4 durante a noite não provoca um aumento da ligação específica de FNT, sugerindo que não há nenhum aumento na síntese de novos receptores. Em consequência, o mecanismo de potenciação do FNT proporcionado pela IL-4 é diferente de mecanismo correspondente ao IFN- γ .

QUADRO II

Efeito da Interleucina-4 sobre a Ligação
do Factor de Necrose Tumoral às Células U.937¹

<u>Tratamento</u>	<u>Ligação</u> <u>Total</u>	<u>Ligação não</u> <u>Específica</u>	<u>Ligação</u> <u>Específica</u>
(Unidades de contagem por minuto)			

Nenhum	1271+20	264+43	1007
Interleucina-4	1203+50	277+25	926

- 1) Efectuou-se o tratamento de células U-937 com IL-4 (1 µg/ml) durante 24 horas à temperatura de 37°C e depois procedeu-se à lavagem com o meio. Incubaram-se 250 000 células à temperatura de 4°C durante 1 hora em 0,2 ml de meio contendo $0,2 \times 10^6$ cpm de ¹²⁵I-FNT tanto na presença como na ausência de 100 nm de FNT não marcado. Depois lavaram-se as células e determinou-se a radioactividade ligada às células conforme descrito no Exemplo 2. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado.

A IL-4 ao ser adicionada sozinha provocou a proliferação de algumas células. Conforme se conclui no Quadro III, a IL-4 aumentou o desenvolvimento da linha celular de tumor da mama ZR-75-1 em quase 40% relativamente ao controlo. Também foram observados efeitos proliferantes celulares em algumas das outras linhas de células mas em menor grau. O desenvolvimento

das células A-431 foi ligeiramente inibido (Quadro II) pela IL-4. Verificou-se que estes efeitos estimulantes do crescimento proporcionados pela IL-4 dependem da dose.

QUADRO III

Modulação do Crescimento de Diversas Linhas de Células de Tumores Humanos na Presença da Interleucina-4 ¹

<u>Tipos de Células</u>	<u>Viabilidade Celular Relativa (Porcentagem)</u>
ZR-75-1 (Tumor da Mama)	140
MDA-MB-4GS (Tumor da Mama)	130
HS-OS7ST (Tumor da Mama)	132
BT-20 (Tumor da Mama)	110
MCF-7 (Tumor da Mama)	125
A-375 (Melanoma)	120
MDA-MB-330 (Tumor da Mama)	110
A-431 (carcinoma Vulvar)	86
U-937 (Linfoma Histiocítico)	110

- 1) Procedeu-se à incubação de 5×10^3 células com Interleucina-4 ($1 \mu\text{g/ml}$) durante 72 horas e depois determinou-se a viabilidade celular relativa pelo método da coloração com violeta de cristal, de acordo com o Exemplo 1. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado.

EXEMPLO 6

Aumento do Efeito Anti-Proliferante da Linfotoxina em Presença de IL-4

A interleucina-4 aumentou os efeitos anti-proliferantes da Linfotoxina (Lt) num teste contra células tumorais. O efeito anti-proliferante da LT (1000 U/ml) sozinha ou em associação com a IL-4 (1 μ g/ml) foi comparado com o efeito do FNT (1000 U/ml) sozinho ou em associação com a IL-4 (1 μ g/ml) numa linha de células de um tumor da mama, MDA-MB-330. Após a incubação de 5×10^3 células em 0,1 ml de meio contendo a quantidade indicada de citocinas durante 72 horas, determinou-se a viabilidade celular conforme descrito no Exemplo 1. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado. Os resultados estão indicados na Figura 5.

O FNT sozinho apresentou um efeito mínimo sobre essas células, inibindo o desenvolvimento celular apenas 5%. A Lt sozinha apresentou um efeito ligeiramente proliferante sobre essas células. A viabilidade celular na presença da IL-4 sozinha variou entre 95 e 98%. Contudo, quando se adicionou a IL-4 às culturas com o FNT ou com a Lt, o desenvolvimento dessas células foi significativamente inibido. Conforme se conclui pela Figura 5, a inibição do desenvolvimento das células tumorais aumentou em quase 60% na presença da IL-4 e do FNT e aumentou 40% na presença da IL-4 e da Lt.

O mecanismo segundo o qual o IFN- γ potencia a resposta

do FNT não é conhecido. Sabe-se que a melhoria da regulação dos efeitos citotóxicos do FNT na presença do INF- γ acompanha a melhoria de regulação dos receptores do FNT (Aggarwal et al., Nature, 318 (1985) 665; Vilcek et al., The Biology of the Interferon System, (1986) 249). Todavia, os estudos da Requerente demonstram que a IL-4 não melhora a regulação dos receptores do FNT nas células que afecta. Apesar de estas observações implicarem que o mecanismo de melhoria da resposta do FNT induzida pela IL-4 seja diferente do correspondente mecanismo do FNT- γ , verificou-se que a melhoria de regulação dos receptores do FNT por acção do IFN- γ não é suficiente mesmo para as suas respostas citotóxicas sinérgicas (Tsujimoto et al., J. Immunol., 137 (1986) 2272-2276; Aggarwal et al., J. Biol. Chem., 262 (1987) 10000-10007). As observações da Requerente indicam também que o IFN- γ potencia a resposta do FNT e da IL-4 conjuntamente. Em consequência, é possível que esses dois agentes realizem as suas funções através de mecanismos independentes. Sabe-se também que a Interleucina-1 aumenta os efeitos citotóxicos do FNT (Ruggiero e Baglioni, J. Immunol., 138 (1987) 0661-0663; Holtmann e Wallach, J. Immunol., 139 (1987) 1161-1167). Desta forma, o mecanismo segundo o qual a IL-4 potencia os efeitos do FNT também não é bem conhecida. Contrariamente ao que sucede no caso do IFN- γ , verificou-se que a IL-1 desregula os receptores para o FNT. Para além das citocinas, existem outros agentes, tais como os inibidores da síntese das proteínas e ainda o recurso a temperaturas eleva-

das, que podem aumentar a citotoxicidade dependente do FNT (Watanabe et al., Cancer Res., 48 (1988) 650-653; Niitsu et al., Cancer Res., 48 (1988) 654-657). Estudos efectuados com inibidores da síntese das proteínas permitem inferir que o FNT induz a síntese de algumas proteínas que protegem as células contra o efeito citotóxico do FNT (Himeno et al., Cancer Res., 50 (1990) 4941-4945; Watanabe et al., Immunopharmacol. Immunotoxicol., 10 (1988) 479-499). Sabe-se que tanto o factor de crescimento epidérmico como o factor de crescimento transformante inibem os efeitos anti-proliferantes do FNT (Sugarman et al., Cancer Res., 47 (1987) 700-786) na presença de diversos tipos de células. Sabe-se que esses factores do crescimento são produzidos por várias células tumorais. Em consequência, é possível que a IL-4 desempenhe as suas funções inibindo a síntese desses factores de crescimento. Também é possível que a IL-4 desempenhe as suas funções desregulando a expressão dos oncogenes c-fos e c-myc, conhecidos como implicados na proliferação celular.

Os ADNc para os receptores de FNT, IFN- γ e IL-4 foram clonados recentemente (Idzerda et al., J. Exp. Med., 171 (1990) 861-873; Schall et al., Cell, 61 (1990) 361-370; Loetscher et al., Cell, 61 (1990) 351-359; Smith et al., Science, 248 (1990) 1019-1023; Auget et al., Cell, 55 (1988) 273-280). Todavia a estrutura destes receptores revelou que o receptor por si só não é suficiente para a transdução do sinal. Sabe-se que a IL-4 pode desmodular a produção do FNT a

partir de macrófagos (Essner et al., J. Immunol., 142 (1989) 3857; Hamilton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (1989) 3803), mas também se sabe que a IL-4 pode aumentar a citotoxicidade mediada por macrófagos (Somers e Erickson, Cell Immunol., 122 (1989) 178-187). Sabe-se que esta última propriedade referida é devida principalmente ao FNT (Feinman et al., J. Immunol., 138 (1987) 635:640). Por essa razão não é evidente a forma pela qual a inibição da produção de FNT está associada ao reforço da citotoxicidade dos macrófagos na presença de IL-4. É possível que o reforço da citotoxicidade dos macrófagos relativamente às células tumorais na presença de IL-4 seja mediada pelos efeitos sinérgicos do FNT e da IL-4 conjuntamente, conforme aqui se descreve. Verificou-se que as células tumorais produtoras de IL-4 exibem uma actividade anti-tumor in vivo contra outros tumores (Tepper et al., Cell, 57 (1989) 503-512). Uma vez que a IL-4 só por si não produz directamente nenhum efeito anti-proliferante em células tumorais em cultura, não se compreende o mecanismo pelo qual a IL-4 actua como agente anti-tumor in vivo. É possível que nesta situação a IL-4 actue como um agente anti-tumor activando os macrófagos ao mesmo tempo que potencia também os efeitos anti-tumor do FNT.

Qualquer especialista na matéria compreenderá facilmente que a presente invenção é particularmente bem adaptada no sentido de proporcionar os objectivos e de consumir as finalidades e vantagens referidas, e ainda de permitir realizar outros

aspectos inerentes. Os componentes, os métodos, os procedimentos e as técnicas agora descritos são actualmente representativos dos aspectos preferenciais e têm como objectivo ser exemplificativos sem que constituam qualquer limitação ao âmbito da presente invenção. Os especialistas na matéria facilmente encontrarão variantes e outras utilizações que se consideram englobadas no espírito da presente invenção e que se encontram definidas no contexto das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

=====

1.- Processo para a preparação de uma composição isenta de células adequada ao tratamento de células tumorais, caracterizado pelo facto de se incorporar o factor de necrose de tumor e interleuquina-4 conjuntamente com agentes auxiliares de formulação adequados.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido factor de necrose de tumor ser factor de necrose de tumor humano.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a interleuquina-4 ser interleuquina-4 humana.

4.- Processo para a preparação de uma composição isenta de células adequada ao tratamento de células tumorais, caracterizado pelo facto de se incorporar o factor de necrose de tumor, interleuquina-4 e interferão com agentes auxiliares de formulação apropriados.

5.- Processo para a preparação de uma composição isenta de células adequada ao tratamento de células tumorais, caracterizado pelo facto de se incorporar linfotoxina e interleuquina-4 com agentes auxiliares de formulação adequados.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de a referida interleuquina-4 ser interleuquina-4 humana.

7.- Processo para a preparação de uma composição isenta de células adequada ao tratamento de células tumorais, caracterizado pelo facto de se incorporar linfotoxina, interleuquina-4 e interferão com agentes auxiliares de formulação adequados.

...

8.- Método para o tratamento de células tumorais, caracterizado pelo facto de se administrar cerca de 120 microgramas/Kg do corpo/dia da composição preparada pelo processo de acordo com as reivindicações anteriores, a um animal que sofre de um tumor.

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Ray Gamm

R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O FACTOR DE NECROSE DE TUMOR E INTERLEUQUINA-4"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma composição farmacêutica que consiste em incorporar o factor da necrose de tumor (FNT) e interleucina-4 (IL-4) com agentes auxiliares de formulação adequados. A composição assim obtida inibe o desenvolvimento de células do cancro da mama em seres humanos, de células do carcinoma vulvar em seres humanos e de células de linfoma histiocítico em seres humanos, consoante a dose administrada. As características de desenvolvimento das células do cancro da mama em seres humanos são minimamente afectadas quando expostas apenas ao FNT ou apenas ao IL-4. Contudo, a combinação destas duas citocinas inibe o desenvolvimento dessas células, consoante a dose. Além disso, o interferão gama (IFN- γ) proporciona uma melhor potenciação dos efeitos antiproliferativos da composição de FNT e de IL-4.

FIG. 1

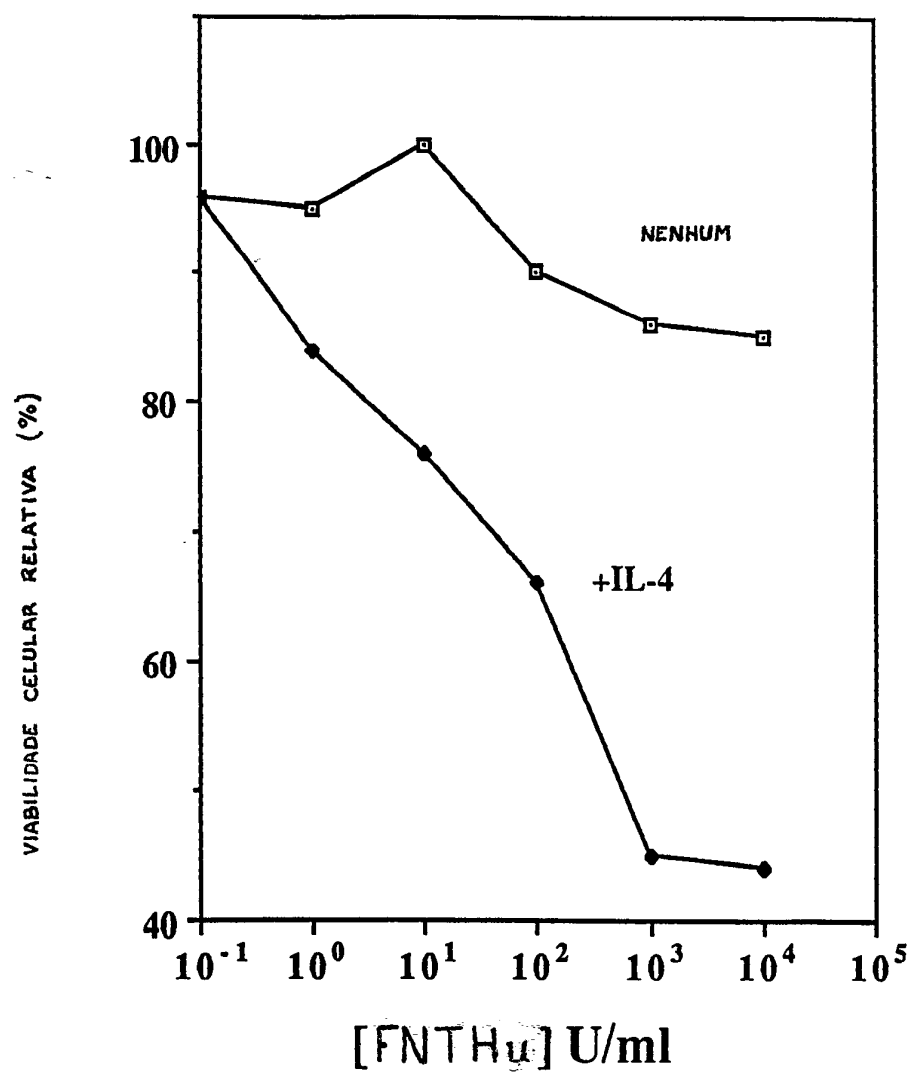


FIG. 2

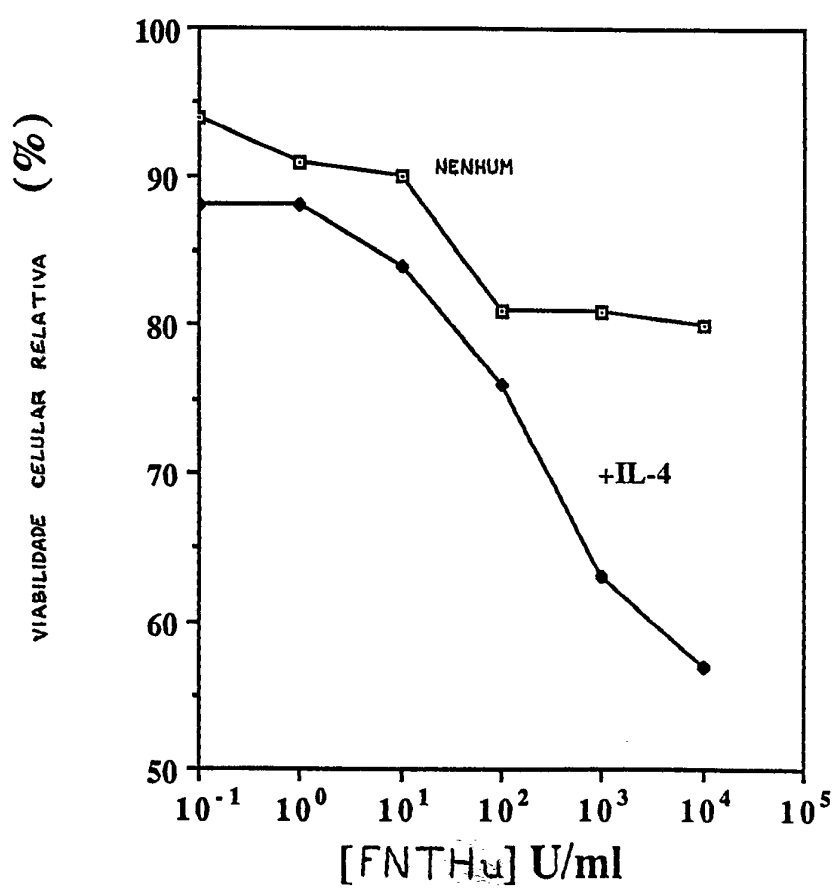
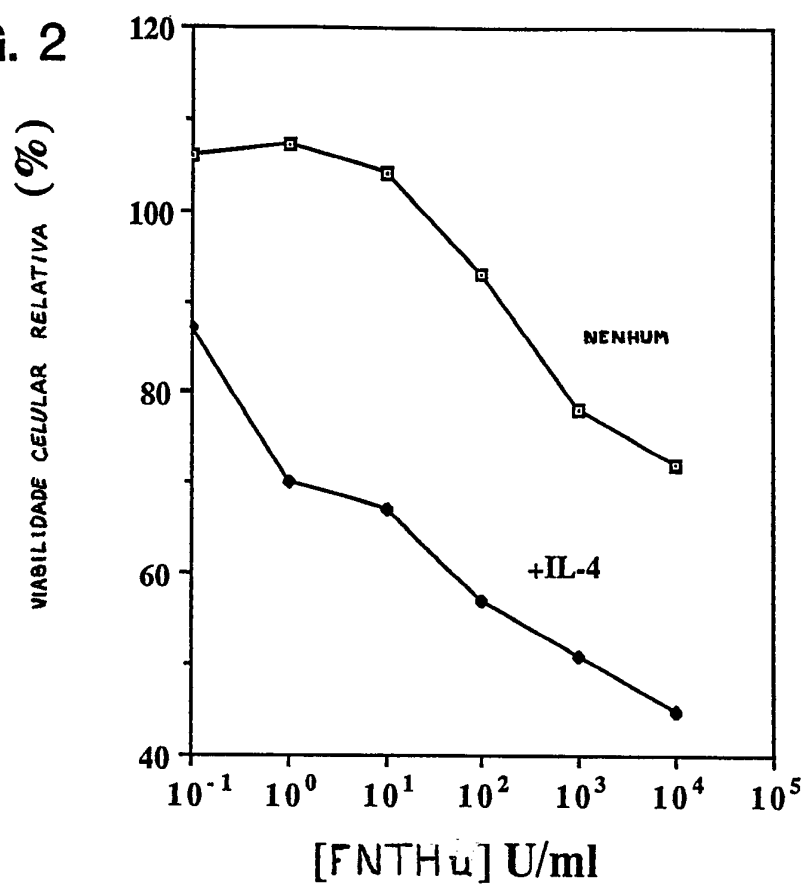


FIG. 3

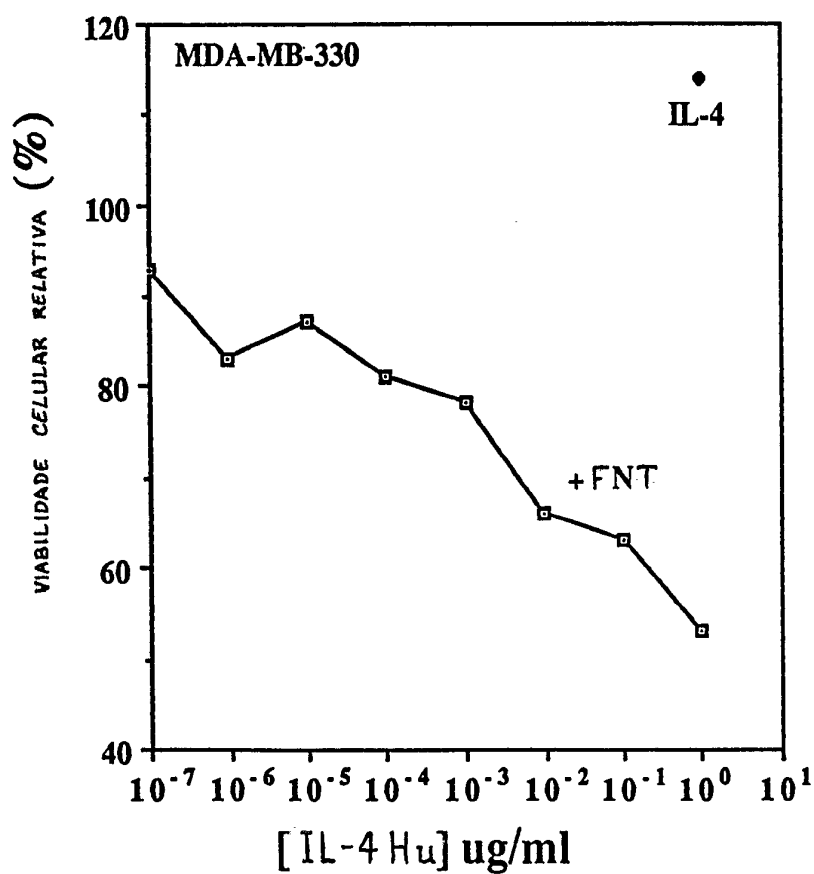
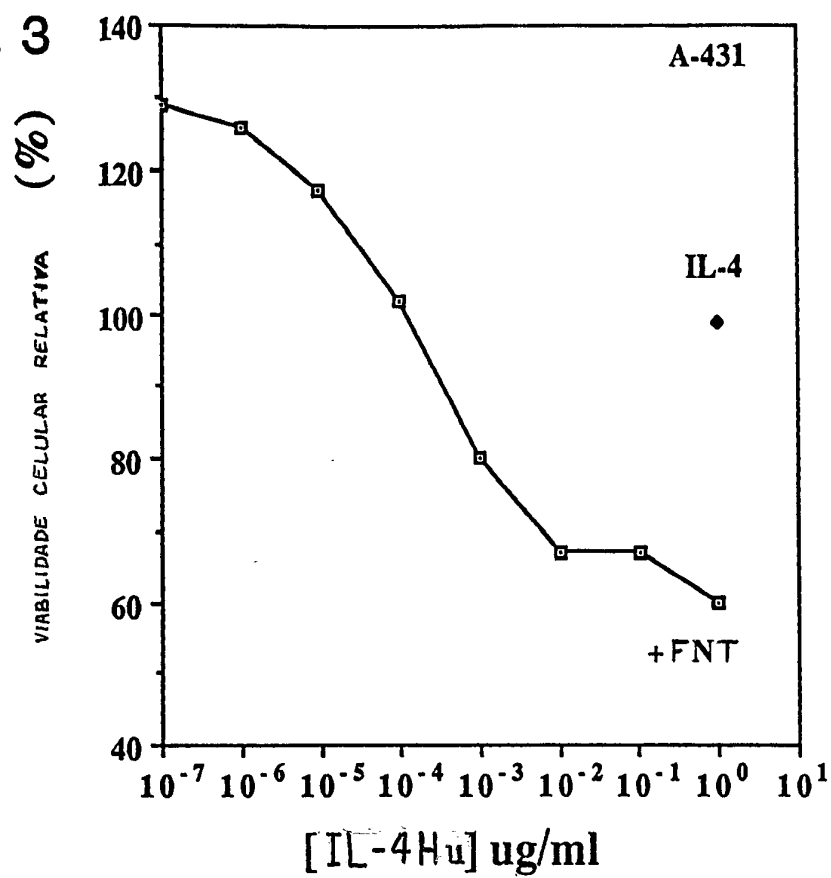


FIG.4

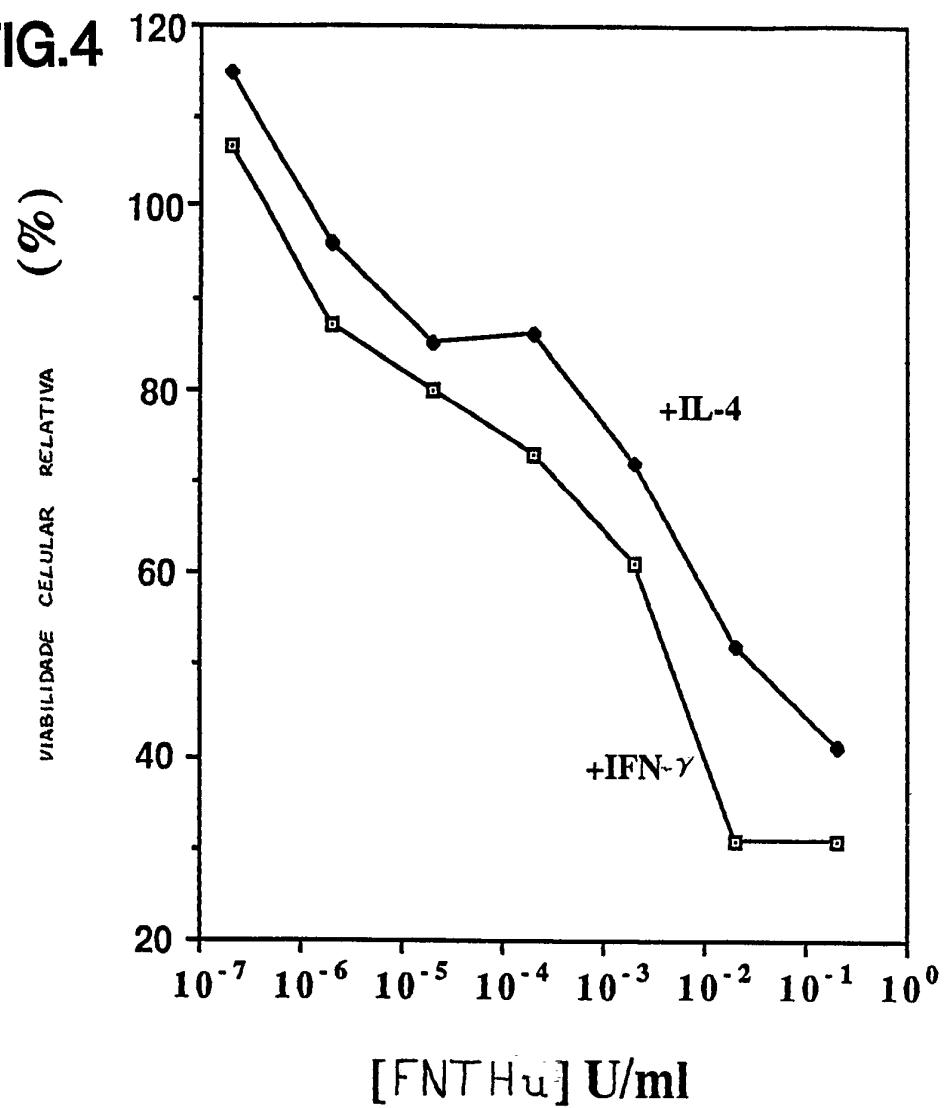


FIG. 5

