



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 372 397**

⑫ Número de solicitud: 201031015

⑬ Int. Cl.:

A61K 38/44 (2006.01) **C12N 9/02** (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **30.06.2010**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2012**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.01.2012

⑱ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑲ Inventor/es: **Mañes Brotón, Santos;**
Mira Dámaso, Emilia;
González Martín, Alicia y
Tardaguila Sancho, Manuel

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Uso de la SOD-3 para la inmunoterapia adyuvante contra el cáncer.**

㉒ Resumen:

Uso de la SOD-3 para la inmunoterapia adyuvante contra el cáncer.

La presente invención se refiere al uso de la Superóxido Dismutasa 3 (SOD-3) como adyuvante en la inmunoterapia contra el cáncer.

DESCRIPCIÓN

Uso de la SOD-3 para la inmunoterapia adyuvante contra el cáncer

La presente invención se refiere al uso de la Superóxido Dismutasa 3 (SOD-3) como adyuvante en la inmunoterapia, especialmente contra el cáncer. La presente invención se enmarca en el sector farmacológico y biomédico de las enfermedades oncológicas y, más concretamente, se basa en la novedosa utilidad de la superóxido dismutasa 3, extracelular, compuestos miméticos de esta enzima o compuestos que aumentan la expresión de SOD-3, para regular diferencialmente el tráfico de distintos subtipos de leucocitos en el parénquima tumoral.

Estado de la técnica anterior

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), tales como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^-) y el peroxinitrito (NOO^-), se han implicado en múltiples procesos fisiopatológicos como la inflamación, el cáncer, la arteriosclerosis y el envejecimiento. Ya que las ROS producen roturas en el ADN, las proteínas, los lípidos y los glicosaminoglicanos (GAGs), el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa para protegerse del daño producido por un exceso de estas especies, generalmente conocido como estrés oxidativo. Un elemento central de estos mecanismos de defensa son las enzimas antioxidantes entre las que se incluyen las catalasas, la glutatión peroxidasa y las superóxido dismutasas (SOD).

Las SOD son las enzimas que catalizan la conversión de los radicales superóxidos en oxígeno molecular (O_2) y H_2O_2 . Hay tres isoenzimas de SOD en mamíferos funcionalmente relacionadas que se diferencian en sus requerimientos de metales y localización celular. En particular, la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD, SOD-3; EC: 1.15.1.1) es responsable de eliminar el superóxido generado en el espacio extracelular. SOD-3 necesita de los iones de cobre y zinc para su actividad enzimática y su estabilidad estructural, respectivamente.

SOD-3 es una glicoproteína tetramérica de 135 kDa. La región N-terminal de la proteína interviene en la estabilización del tetrámero (Stenlund *et al.* 1997. *Protein Sci* 6: 2350-2358). La región C-terminal contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente que permiten su interacción con alta afinidad a heparina (Sandstrom *et al.* 1992. *J Biol Chem* 267: 18205-18209) y al colágeno tipo I (Petersen *et al.* 2004. *J Biol Chem* 279: 13705-13710), lo cual permite anclar esta metaloenzima a la superficie celular y la matriz extracelular. Esta localización tan específica de SOD-3 sugiere que un papel de la enzima es proteger elementos concretos de la matriz extracelular (MEC) del daño producido por el estrés oxidativo (Oury *et al.* 1994. *Lab Invest* 70: 889-898). También se ha observado que la región C-terminal puede procesarse proteolíticamente, generando formas de baja afinidad para su unión a componentes de la MEC (Olsen *et al.* 2004. *J Biol Chem* 279: 22152-22157). Dicho procesamiento afecta a la biodistribución de la proteína y puede por tanto constituir un mecanismo adicional de regulación. Finalmente, se ha sugerido que SOD-3 puede existir en al menos dos conformaciones diferentes, una activa y otra inactiva, en función del patrón de puentes disulfuro generados duran-

te el plegamiento de la proteína (Petersen *et al.* 2003. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13875-13880).

Debido a su papel en la detoxificación de ROS y RNS, SOD-3 se ha implicado en múltiples procesos fisiopatológicos. Así se ha observado que la deslocalización o pérdida de actividad de SOD-3 contribuye a la desregulación de la vasodilatación mediada por óxido nítrico en enfermedades cardiovasculares (Faraci y Didion 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1367-1373). En diabetes, alteraciones en la modificación por azúcares de SOD-3 se ha asociado con una disminución en la afinidad por heparina y una pérdida de la función vascular (Adachi *et al.* 1992. *Free Radic Biol Med* 13: 205-210). La sobre-expresión de SOD-3 en ratones preserva la función cardíaca y disminuye el tamaño del infarto en modelos de isquemia-reperfusión (Nozik-Grayck *et al.* 2005. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2466-2471). Además de su papel en enfermedades cardiovasculares, SOD-3 también se ha implicado en la transición de la circulación fetal a la adulta (Nozik-Grayck *et al.* 2000. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L977-984).

SOD-3 también tiene un importante papel en modular el daño oxidativo, la inflamación y la fibrosis pulmonar (Oury *et al.* 2002. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L777-784). Se ha reportado que ratones deficientes en SOD-3 sufren daños pulmonares por hiperoxia más severos que los ratones silvestres (Carlsson *et al.* 1995. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6264-6268), mientras que ratones transgénicos para SOD-3 tienen respuestas más atenuadas en tales condiciones (Folz *et al.* 1999. *J Clin Invest* 103: 1055-1066). También se ha observado que SOD-3 atenúa la infiltración de neutrófilos en pulmones por hiperoxia o tratamiento con lipopolisacárido (LPS) (Folz *et al.* 1999. *J Clin Invest* 103: 1055-1066; Bowler *et al.* 2002. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L719-726). Relacionado con la capacidad de disminuir la inflamación, se ha comunicado que los ratones deficientes en SOD-3 tienen síntomas más severos en modelos de artritis inducida por colágeno (Ross *et al.* 2004. *Arthritis Rheum* 50: 3702-3711), mientras que la administración de SOD-3 atenúa dichos síntomas (Iyama *et al.* 2001. *Arthritis Rheum* 44: 2160-2167).

Respecto al papel de SOD-3 en cáncer, se ha asociado el polimorfismo rs699473 de SOD-3 con un mayor riesgo a padecer gliomas y meningiomas (Rajaraman *et al.* 2008. *Neuro Oncol* 10: 709-715). SOD-3 se ha implicado en la regulación de la proliferación y la capacidad invasiva de células tumorales *in vitro* (Tanaka *et al.* 2001. *Gene Ther* 8: 149-156; Teoh *et al.* 2009. *Cancer Res* 69: 6355-6363). Así mismo, la secreción de SOD-3 por células musculares tras la infección con un adenovirus recombinante restringió el crecimiento de células de melanoma en ratones singénicos (Wheeler *et al.* 2003. *Mol Cáncer Res* 1: 871-881). También se ha demostrado que la sobre-expresión de SOD-3 en la piel ejerce un efecto protector de la inflamación e hiperplasia asociada al tratamiento con ésteres de forbol (Ha *et al.* 2006. *BBRC* 348 (2): 450-458), así como una disminución en el número de tumores de piel formados como consecuencia de tratamientos químicos (Ha *et al.* 2006. *BBRC* 348 (2): 450-458; WO/2005/042583).

Por tanto, las evidencias acumuladas, aunque indirectas, sugieren que SOD-3 puede actuar a nivel de las células tumorales inhibiendo su crecimiento o ma-

lignidad *in vitro*, así como impidiendo la formación de tumores de piel *in vivo*. No obstante, hasta la fecha no se ha descrito un papel de SOD-3 en la infiltración diferencial de subtipos específicos de leucocitos en el parénquima tumoral, ni en su posible utilidad para mejorar los tratamientos inmunoterapéuticos, motivo de la presente invención.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una nueva solución para la mejora de la respuesta inmune. La presente invención describe la sorprendente utilidad de una composición farmacéutica que comprende una Superóxido dismutasa extracelular como es la Superóxido dismutasa 3 (SOD-3) para mejorar la respuesta inmune de enfermedades como el cáncer o enfermedades infecciosas.

Los inventores han demostrado que la sobreexpresión de SOD-3 en el microambiente tumoral aumenta el número de linfocitos T citotóxicos y que el aumento en los niveles de SOD-3 favorece la eliminación de células tumorales por parte de células del sistema inmune. En base a esto, SOD-3 o compuestos miméticos de su actividad o compuestos que aumenten la expresión de SOD-3, pueden ser útiles para la elaboración de nuevas composiciones farmacéuticas para la profilaxis y la inmunoterapia del cáncer.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una Superóxido dismutasa extracelular para preparar un medicamento destinado a inmunoterapia. En una realización preferida, la Superóxido dismutasa extracelular es la Superóxido Dismutasa 3 (SOD-3).

El término “inmunoterapia”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al conjunto de estrategias destinadas a inducir, estimular o deprimir el sistema inmune. La inmunoterapia destinada a activar el sistema inmune se emplea especialmente frente al cáncer y frente a enfermedades infecciosas, mientras que la inmunoterapia destinada a deprimir el sistema inmune se emplea en casos de autoinmunidad o alergias.

En una realización preferida, la inmunoterapia comprende el aumento en el número de linfocitos CD8+ citotóxicos (CTL). El número de CTL, puede verse aumentado en sangre, en los ganglios linfáticos o en cualquier tejido del cuerpo, pudiendo ser éste un tejido tumoral o un tejido infectado. Los linfocitos son un tipo de leucocito o glóbulo blanco del sistema inmune y se dividen en distintos tipos que actúan de distinta forma. Los linfocitos T se producen en el timo y son los responsables de la respuesta inmune celular. Dentro de los linfocitos T, los linfocitos T citotóxicos se encargan de eliminar las células infectadas o células tumorales y se caracterizan por exhibir en su superficie celular una glicoproteína denominada CD8, por lo que también se les conoce como linfocitos CD8+.

En una realización preferida, la inmunoterapia comprende la disminución del número de células mieloides. El número de células mieloides puede verse disminuido en sangre, en los ganglios linfáticos o en cualquier tejido del cuerpo, pudiendo ser éste un tejido tumoral o un tejido infectado. En la presente descripción, el término “células mieloides” se refiere a las células del linaje mielóide, y particularmente a fagocitos que son circulantes y sólo entran en los tejidos en situaciones de inflamación, donde se comportan como macrófagos, que generalmente inhiben

la función efectora de los linfocitos T y favorecen el crecimiento tumoral.

En una realización preferida, la inmunoterapia comprende el aumento de la diapédesis de los linfocitos citotóxicos. En otra realización preferida, la inmunoterapia comprende la disminución de la diapédesis de las células mieloides. En la presente descripción, el término “diapédesis” se refiere a la salida de los linfocitos del torrente sanguíneo, es decir, a su extravasación a través de las células endoteliales que forman dichos vasos, a un tejido.

En una realización preferida, la inmunoterapia es una inmunoterapia adyuvante contra el cáncer. Preferiblemente, dicha inmunoterapia comprende el aumento de la eliminación de las células cancerosas por parte de los linfocitos citotóxicos. En la presente descripción, el término “adyuvante” se refiere a una sustancia que modifica el efecto terapéutico de una composición farmacéutica. En este caso, la composición farmacéutica se emplea para el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el cáncer es de origen hematopoyético. El término “hematopoyético” hace referencia al tipo de cáncer y a que proviene de células de la sangre. Más preferiblemente, el cáncer es un linfoma, que es un tumor sólido hematológico. Aún más preferiblemente, es un linfoma tímico.

En otra realización preferida, la inmunoterapia es una inmunoterapia adyuvante contra una enfermedad infecciosa.

En una realización preferida, la administración es oral. En otra realización preferida, la administración es parenteral. La administración parenteral es aquella que se realiza a través de una inyección o infusión. Algunos ejemplos de administración parenteral son la inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular.

En una realización preferida, el medicamento además comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente es un componente de una composición farmacéutica que no es un compuesto activo sino un diluyente, un vehículo o un relleno, entre otros, que se considera farmacéuticamente aceptable cuando es seguro, no es tóxico y no presenta efectos adversos.

En una realización preferida, el medicamento se administra como terapia combinada. Preferiblemente, dicha terapia combinada se lleva a cabo con un fármaco quimioterapéutico. Ejemplos de fármacos quimioterapéuticos son compuestos citotóxicos como las antracilinas, daunorubicina, adriamicina, derivados de docetaxel, alcaloides de la vinca, vincristina, carmustina, cisplatino, fluorouracilos, compuestos citostáticos como los inhibidores de poliamina, tamoxifeno, prodasona o sandostatina, o compuestos que inducen la apoptosis como el butirato sódico o la mitomicina C, antibióticos como las penicilinas, betalactaminas, cefalosporinas, ciclinas, aminoglucósidos, macrólidos o sulfamidas, o antivirales como el AZT, inhibidores de proteasas o aciclovir, retrovir o foscarnet.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la eficacia de SOD-3 en la activación de la respuesta citotóxica contra las células tumorales y la consecuente reducción en el tamaño tumoral. A. Las células OT1 (linfocitos CD8+) en presencia de SOD-3 son capaces de eliminar más eficazmente las células tumorales y reducir el volumen del tumor. B. Las células OT1 (linfocitos CD8+) en presencia de SOD-3 son capaces de eliminar más eficazmente las células tumorales y reducir el peso del tumor. C. En presencia de SOD-3 hay un mayor número de células OT1 que infiltran el tumor.

Figura 2. Muestra que la eficacia de SOD-3 en la activación de la respuesta citotóxica contra las células tumorales y la consecuente reducción en el tamaño tumoral es independiente de la fuente de SOD-3. A. Las células OT1 (linfocitos CD8+) son capaces de eliminar más eficazmente las células tumorales y reducir el volumen del tumor en presencia de SOD-3 expresada por células endoteliales Ig11. B. Las células OT1 (linfocitos CD8+) son capaces de eliminar más eficazmente las células tumorales y reducir el peso del tumor en presencia de SOD-3 expresada por células endoteliales Ig11.

Figura 3. Muestra que la presencia de SOD-3 aumenta la presencia de células linfoides, pero no la de células mieloides. A y B. La presencia de SOD-3 aumenta la migración de células linfoides pero no la de células mieloides en ensayos *in vitro*. C y D. La presencia de SOD-3 aumenta la adhesión de las células linfoides pero no la de células mieloides a las células endoteliales en ensayos *in vitro*.

Figura 4. Muestra que la presencia de SOD-3 aumenta la infiltración de células linfoides pero no la de células mieloides en el tejido tumoral en ensayos *in vivo*.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del uso de la Superóxido Dismutasa 3 (SOD-3) como adyuvante en la inmunoterapia contra el cáncer.

Materiales y Métodos

Ratones

Los ratones C57BL/6J y OT1 (C57BL/6-Tg (TcrbTcrb) 1100Mjb/J) y (C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)) se adquirieron en Jackson Laboratories. Los ratones OT1 contienen insertos para los genes del receptor de células T (TCR)- $\alpha 2$ y TCR- $\beta 5$. El receptor transgénico se diseñó para reconocer el péptido de ovalbúmina (OVA) que contiene los residuos 257-264 en el contexto del MHC de clase I H2K^b. Los ratones C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) expresan la proteína verde fluorescente (EGFP o GFP) bajo el control del promotor de la β -actina de pollo (CAG). Todos los experimentos que implicaron el uso de animales fueron supervisados por el Comité de Ética del CNB (CSIC, Madrid) y se llevaron a cabo según la normativa de la Unión Europea.

Líneas celulares

La línea celular EG7 (ATCC, CRL-2396) es un linfoma tímico que expresa ovalbúmina. Esta línea se creció en medio RPMI suplementado con 10% suero de ternera fetal (STF), L-glutamina, antibióticos y β -mercaptoetanol. La línea endotelial Ig11 (Garlanda *et al.* 1994. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7291-7295) fue aislada de pulmón de ratón, y se cultivó en placas recubiertas con 1% gelatina en un medio

de cultivo DMEM suplementado con 20% FCS, L-glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, ECGS (del inglés "endothelial cell growth supplement"), heparina y antibióticos. Con objeto de sobre-expresar SOD-3 de ratón en las dos líneas celulares, se obtuvieron partículas retrovirales con el ADN que codifica para SOD-3 de ratón (Open Biosystem) y las correspondientes partículas control utilizando un plásmido bicistrónico que contiene el ADN que codifica para el marcador fluorescente GFP. Las células se transdujeron con ambos tipos de partículas y se seleccionaron por citometría de flujo aquellas células con una emisión intensa de fluorescencia.

Experimentos de formación de tumores

Las células EG7 control o sobre-expresando SOD-3 de ratón se utilizaron para inducir tumores subcutáneos. Se inocularon 5×10^6 células subcutáneamente en el flanco derecho de ratones C57BL/6J. En el caso de inocular células EG7 y Ig11 simultáneamente, se mezclaron en una relación 4:1. A los 3 días se transfirieron 10×10^6 células CD8⁺ aisladas de los ratones OT1 por inyección intravenosa. Un grupo de ratones permaneció sin tratar y se consideró el grupo control. El crecimiento de los tumores se monitorizó cada 2 ó 3 días. El volumen se estimó a partir de la medida del ancho (a) y la longitud (b) de la masa tumoral efectuada con un calibre y aplicando la fórmula ($a^2 \times b$)/2. A los 17 días tras la transferencia adoptiva, los ratones se sacrificaron y los tumores extirpados fueron pesados. Las muestras tumorales fueron repartidas en fragmentos equivalentes y almacenadas adecuadamente para su utilización posterior.

Análisis del infiltrado de tumores

Los tumores producidos por inyección de las células EG7 se disgregaron mecánicamente con objeto de marcar las poblaciones celulares leucocitarias. Las células OT1 en estos tumores se localizaron por el mareaje con los anticuerpos $\alpha 2$ (clon B20.1, Pharmingen), CD8 (clon 53-6.7, eBiosciences), $\beta 5$ (clon MR9-4, Pharmingen), seguido de una segunda incubación con Avidina-APC (Beckman Coulter). Se identificaron las células transferidas adoptivamente como las que expresan simultáneamente los marcadores $\alpha 2$, $\beta 5$ y CD8. Los mareajes se analizaron en un citómetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter) o en un citómetro BD LSR II System (Becton Dickinson).

Purificación de células mieloides y linfoides

Se purificaron células CD3⁺ o CD11b⁺ a partir de bazo de ratones C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) o C57BL/6J por selección negativa usando bolas magnéticas tapizadas con anticuerpos de oveja anti-IgG de rata (Dynabeads, Invitrogen). Después de bloquear los esplenocitos con IgG murina durante 10 minutos a 4°C, las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C con anticuerpos de rata anti-CD19 de ratón (clon 1D3, BD Pharmingen) y anti-CD11 de ratón (clon M1/70, BD Pharmingen) para obtener las células CD3⁺, o con los anticuerpos anti-CD19 de ratón y anti-CD3 de ratón (clon 17A2, BD Pharmingen) para la purificación de las células CD11b⁺. En todos los casos se añadieron las bolas magnéticas, se incubaron durante 30 minutos a 4°C y se seleccionaron aquellas células que no quedaron unidas, que se utilizaron sin marcar (las procedentes de los ratones CAG-EGFP) o marcadas con el colorante vital CMTMR (C2927, Invitrogen) en los ensayos de adhesión y migración celular subsiguientes.

Ensayos de migración en transwell

La migración se llevó a cabo en pocillos *transwell* de 3 μm de poro (Costar) recubiertos previamente con células endoteliales Ig11 (1×10^5). En una primera serie de experimentos, las células Ig11 fueron pretratadas durante 14 horas a 37°C con el medio condicionado por las células tumorales N202.1A (N202.1A-*mock* (sin modificar)) o con el medio condicionado por las células N202.1A que sobre-expresan SOD-3 (N202.1A-SOD-3). Tras una etapa de lavado, se añadieron 10^6 células CD3+ o CD11b+ purificadas (ver arriba) al pocillo superior del *transwell* y el pocillo inferior se rellenó con 600 μl de medio de cultivo con 10% de STF como quimioatrayente. Tras 3 horas de incubación a 37°C, se analizó por citometría de flujo el número de células que migraron al pocillo inferior.

En una segunda serie de experimentos, se tapizaron los *transwell* con las células Ig11-SOD-3 y Ig11-GFP, sobre las que añadieron 1×10^6 células CD3+ purificadas. En este caso se usó CCL19 como quimioatrayente y el número de células que migraron al pocillo inferior se analizó por citometría de flujo tras 3 h de incubación.

Ensayos de adhesión

En un primer experimento, las células endoteliales Ig11 (2×10^5) se sembraron sobre la superficie de portaobjetos divididos en 8 pocillos (Lab-Tek II Chamber Slide System, Nunc) previamente tapizados con gelatina, y pretratados con los medios condicionados N202.1A-*mock* y N202.1A-SOD-3. Tras eliminar el medio condicionado, se añadieron 10^6 células CD3+ y CD11b+ obtenidas a partir de esplenocitos de ratones C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) como se describió anteriormente. A los tiempos indicados, las células no adheridas se retiraron mediante 2 lavados con tampón fosfato y las que permanecieron adheridas se fijaron con 4% formaldehído durante 10 minutos a 20°C. Los portaobjetos se montaron con Vectashield (Vector Laboratories) conteniendo DAPI para teñir los núcleos y se examinaron en un microscopio de fluorescencia Leica con un aumento de 200x.

En un segundo experimento, las células CD3+ y CD11b+ aisladas a partir de bazos de ratones C57BL/6 se marcaron con el colorante vital CMTMR y se depositaron sobre portaobjetos sembrados con células Ig11-GFP y Ig11-SOD-3. A los tiempos indicados, las células no adheridas se lavaron y las adheridas se procesaron como se indicó anteriormente. En todos los casos, las imágenes adquiridas se procesaron con el programa NIH-ImageJ para cuantificar el número de células negativas para GFP o positivas para CMTMR. Las imágenes se transformaron a una escala de 8 bits, después se eliminó el ruido de fondo y se obtuvo el número de partículas automáticamente. Ejemplo 1

SOD-3 aumenta la eficacia de la inmunoterapia con linfocitos CD8+ específicos contra antígenos tumorales

La identificación de antígenos asociados a células tumorales ha revitalizado la generación de terapias anti-tumorales basadas en el sistema inmune. Dichas estrategias inmunoterapéuticas requieren la inducción de una inmunidad efectiva de linfocitos T. Los linfocitos T CD8+, también llamados citotóxicos (CTL), se han mostrado efectivos para eliminar tumores sólidos tanto en humanos como en modelos experimentales

murinos (Hanson *et al.* 2000. Immunity 13: 265-276; Rosenberg 2001. Nature 411(6835): 380-384; Boissonnas *et al.* 2007. J Exp Med 204: 345-356). No obstante, una limitación importante de la inmunoterapia contra el cáncer es asegurar que el número de CTL que infiltran el tumor sea suficientemente elevado para eliminar las células neoplásicas en el ambiente inmunosupresor creado por las células malignas y las células inmunosupresoras presentes en el microambiente tumoral (Rosenberg 2001. Nature 411 (6835): 380-384).

Análisis de la eficiencia de eliminación de tumores por los CTL

Se realizaron experimentos de transferencia adoptiva de células CD8+ purificadas de ratones OT1. Los ratones OT1 son transgénicos para un receptor de células T (TCR) V α 2/V β 5 específico para el péptido de OVA que comprende los aminoácidos 257-264. Por tanto, tras su activación, las células OT1 son capaces de promover una respuesta citotóxica capaz de eliminar las células tumorales EG7, que expresan OVA como antígeno tumoral (Boissonnas *et al.* 2007. J Exp Med 204: 345-356).

Así, se generaron tumores subcutáneos con las células EG7-*mock* y EG7-SOD-3 en ratones inmunocompetentes y, cuando estos alcanzaron los 2-3 mm³, se transfirieron células OT1 *naïve* (que no han sido activadas por el antígeno previamente) por vía intravenosa. El crecimiento de los tumores (medido como el volumen tumoral) se monitorizó durante los días subsiguientes.

La transferencia adoptiva de células OT1 redujo el ritmo de crecimiento de los tumores EG7 en todos los casos. Sin embargo, esta disminución inducida por las células OT1 fue significativamente mayor en el caso de los tumores EG7-SOD-3 (Fig. 1A). Dos de los diez ratones con tumores EG7-SOD-3 transferidos con células OT1 experimentaron una regresión total del tumor, mientras que dicha regresión no se observó en ninguno de los tumores EG7-*mock* transferidos con las células OT1.

El peso de los tumores tras el sacrificio demostró también el menor tamaño de los tumores EG7-SOD-3 transferidos con las células OT1 (Fig. 1B). Este menor tamaño de los tumores EG7-SOD-3 correlacionó positivamente con una mayor infiltración de células OT1, en comparación con los tumores EG7-*mock* transferidos con OT1 (Fig. 1C). Por lo tanto, estos resultados indican que el aumento de los niveles de SOD-3 en el ambiente tumoral favorece la infiltración de CTL anti-tumorales y por tanto mejora la eficacia de la transferencia adoptiva contra dichos tumores.

También se generaron tumores subcutáneos con una mezcla de células EG7 y células Ig11 que expresan o no SOD-3. Cuando estos tumores alcanzaron los 2-3 mm³ se realizó la transferencia adoptiva de células OT1. Las células OT1 redujeron más eficientemente el crecimiento de los tumores que contenían las células Ig11-SOD-3, que de aquellos que contenían las células Ig11-GFP (Fig. 2A). Esto mismo se verificó por el menor peso de los tumores en el grupo de ratones que tenían los tumores EG7 + Ig11-SOD-3 transferidos con células OT1 (Fig. 2B). Estos resultados indican que el aumento de los niveles de SOD-3 es relevante para aumentar la eficacia de la transferencia adoptiva, independientemente de la fuente celular que produzca SOD-3.

Ejemplo 2

SOD-3 regula diferencialmente la trans migración de células mieloides y linfoides in vitro

Se analizó la relevancia funcional de expresar SOD-3 en las células tumorales. Se analizó cómo los niveles de SOD-3 regulan la migración de células linfoides (CD3+) y mieloides (CD11b+) en ensayos tipo *transwell in vitro*. En este tipo de ensayos, se analiza la capacidad de las células motivo de estudio, situadas en la cámara superior del *transwell*, para trans migrar a través de una membrana porosa en respuesta a una molécula quimioatrayente. Para simular la situación *in vivo*, se creció una monocapa de células endoteliales de ratón 1g11 sobre la membrana porosa. Las células 1g11 se pretrataron durante 12 h con el medio condicionado de células N202.1A, una línea de adenocarcinoma de mama derivada de un tumor FVB-Tg (MMTV-neu) (Nanni, Pupa *et al.* 2000. Int J Cancer 87(2): 186-194), que sobre-expresan o no la SOD-3 murina. De esta forma, las células 1g11 se encuentran expuestas a distintos ambientes ricos o no en SOD-3. Finalmente se depositaron sobre esta monocapa las células CD3+ o CD11b+ purificadas de bazo por selección negativa con anticuerpos específicos acoplados a bolas magnéticas. Tres horas después se analizó el número de células CD3+ o CD11b+ que habían trans migrado frente a un medio con 10% de suero fetal de ternera como fuente de quimioatrayente.

La migración específicamente de las células CD3+ aumentó de forma significativa en presencia de SOD-3, comparada con el medio condicionado de las células N202.1A-*mock* (Fig. 3A). Por el contrario, el número de células mieloides CD11b+ en el pocillo inferior no varió en presencia o ausencia de SOD-3. Estos resultados indican que la exposición de las células endoteliales a altos niveles de SOD-3 favorece la diapédesis de los linfocitos T, pero no de las células mieloides.

También se realizaron experimentos de migración en *transwell* usando una monocapa de células 1g11-GFP o 1g11-SOD-3. En estas condiciones, las propias células endoteliales producen o no SOD-3. Se analizó la migración de células CD3+ o CD11b+ a través de estas monocapas usando como quimioatrayentes las quimioquinas CCL19, que induce la migración específica de células CD3+ *naïve*, y CCL2, un quimioatrayente para células mieloides. De nuevo se observó un aumento en la migración de linfocitos CD3+ cuando las células endoteliales sobre-expresaban SOD-3, mientras que la migración de células CD11b+ dirigida por CCL2 no varió por la presencia de SOD-3 (Fig. 3B). Estos resultados demuestran un papel directo de SOD-3 en la trans migración de linfocitos T (CD3+).

El proceso de trans migración implica la adhesión firme de los leucocitos a las células endoteliales, en un proceso mediado por la comunicación cruzada entre quimioquinas e integrinas. Se analizó si SOD-3 podría afectar diferencialmente a la interacción entre las células CD3+ o CD11b+ y las células endoteliales. Para ello, se pretrataron las células endoteliales 1g11 con el medio condicionado de las células N202.1A-*mock* o N202.1A-SOD-3 y, tras retirar dichos medios condicionados, se añadieron las células CD3+ o CD11b+ purificadas de un ratón transgénico para la proteína verde fluorescente (GFP). Tras distintos tiempos de incubación, se lavaron las monocapas dos veces y se determinó el número de células verdes, correspondientes a las células CD3+ o CD11b+ procedentes del ratón GFP, que se habían quedado adheridas.

La presencia de SOD-3 en el medio condicionado de las células N202.1A favoreció específicamente la adhesión de las células CD3+ (Fig. 3C).

Los ensayos de adhesión se repitieron usando las células 1g11-GFP y 1g11-SOD-3. En esta ocasión se usaron células CD3+ o CD11b+ aisladas de un ratón normal, y se marcaron *ex vivo* con el colorante rojo fluorescente CMTMR. A los tiempos indicados se lavaron las monocapas y se determinó el número de células rojas que permanecían adheridas. Se observó que la sobre-expresión de SOD-3 por las células endoteliales aumentó significativamente ($p < 0,05$, test *t-Student* 2 colas) la adhesión de las células CD3+ a los tiempos estudiados, mientras que no afectó a la adhesión de las células CD11b+ (Fig. 3D).

Ejemplo 3

SOD-3 regula diferencialmente la trans migración de células mieloides y linfoides in vivo

Se analizó si el aumento de los niveles de SOD-3 en el ambiente tumoral podría regular la infiltración diferencial de linfocitos al tumor *in vivo*. Para ello, se indujo la expresión ectópica de SOD-3 en células EG7. Las células EG7-*mock* y EG7-SOD-3 se utilizaron para inducir tumores subcutáneos en ratones sintéticos. Dos días después, los ratones fueron sacrificados y se cuantificaron las células CD3+ (linfocitos T) y las células CD11b+ (mieloides) que habían infiltrado el tumor mediante citometría de flujo con anticuerpos para marcadores específicos. Se encontró un número significativamente mayor de linfocitos T en el parénquima de los tumores EG7-SOD-3 que en los EG7-*mock* (Fig. 4). Por el contrario, no se observaron cambios en el número de células mieloides que infiltraron dichos tumores (Fig. 4). Por lo tanto, SOD-3 favorece la adhesión y diapédesis específicamente de los linfocitos T tanto *in vitro* como *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición farmacéutica que comprende una Superóxido dismutasa extracelular para preparar un medicamento destinado a inmunoterapia.

2. Uso según la reivindicación anterior donde la Superóxido dismutasa extracelular es la Superóxido Dismutasa 3 (SOD-3).

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para preparar un medicamento para inmunoterapia adyuvante contra el cáncer.

4. Uso según la reivindicación anterior donde el cáncer es de origen hematopoyético.

5. Uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde el cáncer es un linfoma.

6. Uso según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores donde el cáncer es un linfoma tímico.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1

a 2 para preparar un medicamento destinado a inmunoterapia contra una enfermedad infecciosa.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la administración es oral.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** porque la administración es parenteral.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento además comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque se administra como terapia combinada.

12. Uso según la reivindicación anterior donde la terapia combinada se lleva a cabo con un fármaco quimioterapéutico.

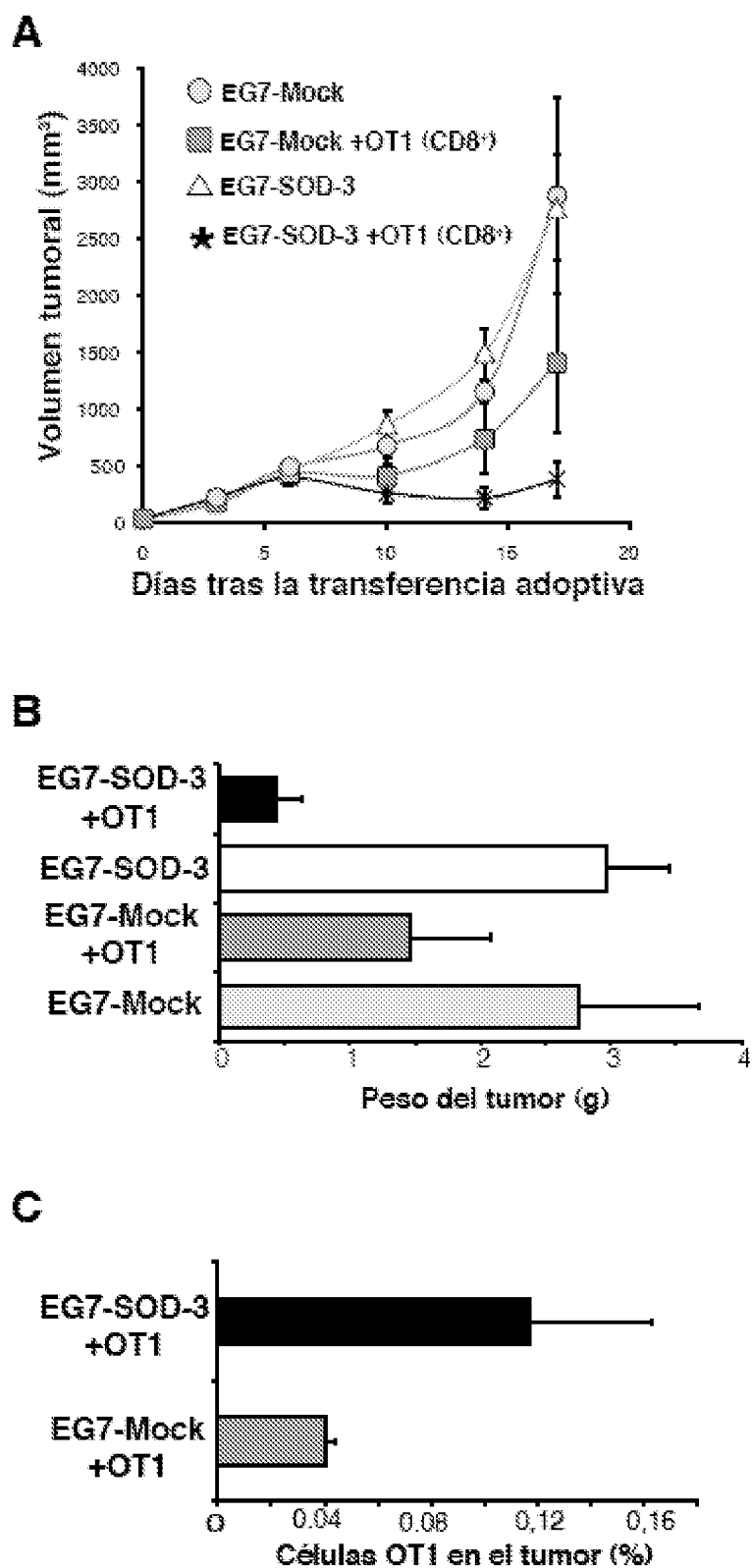


FIG. 1

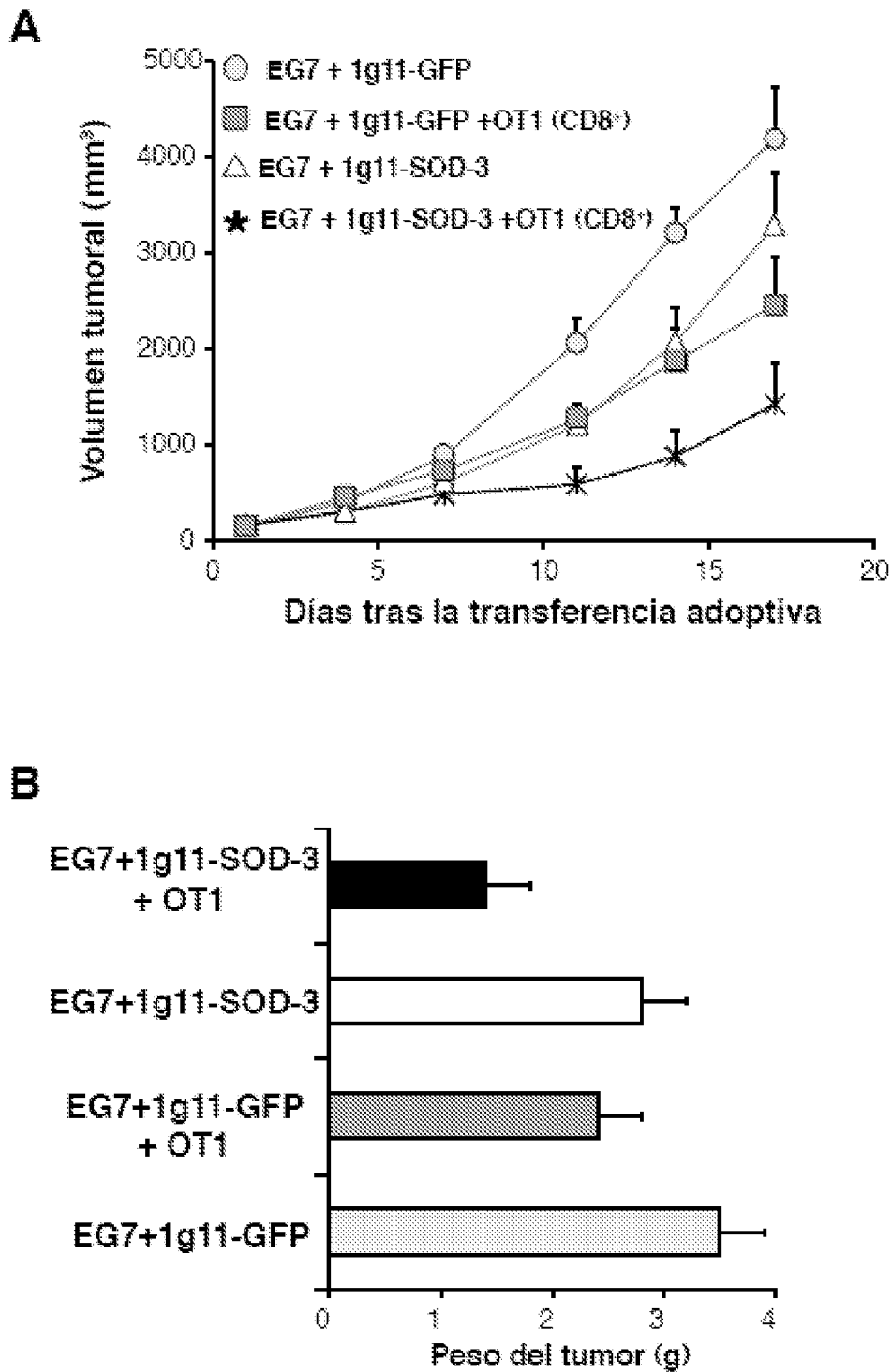


FIG. 2

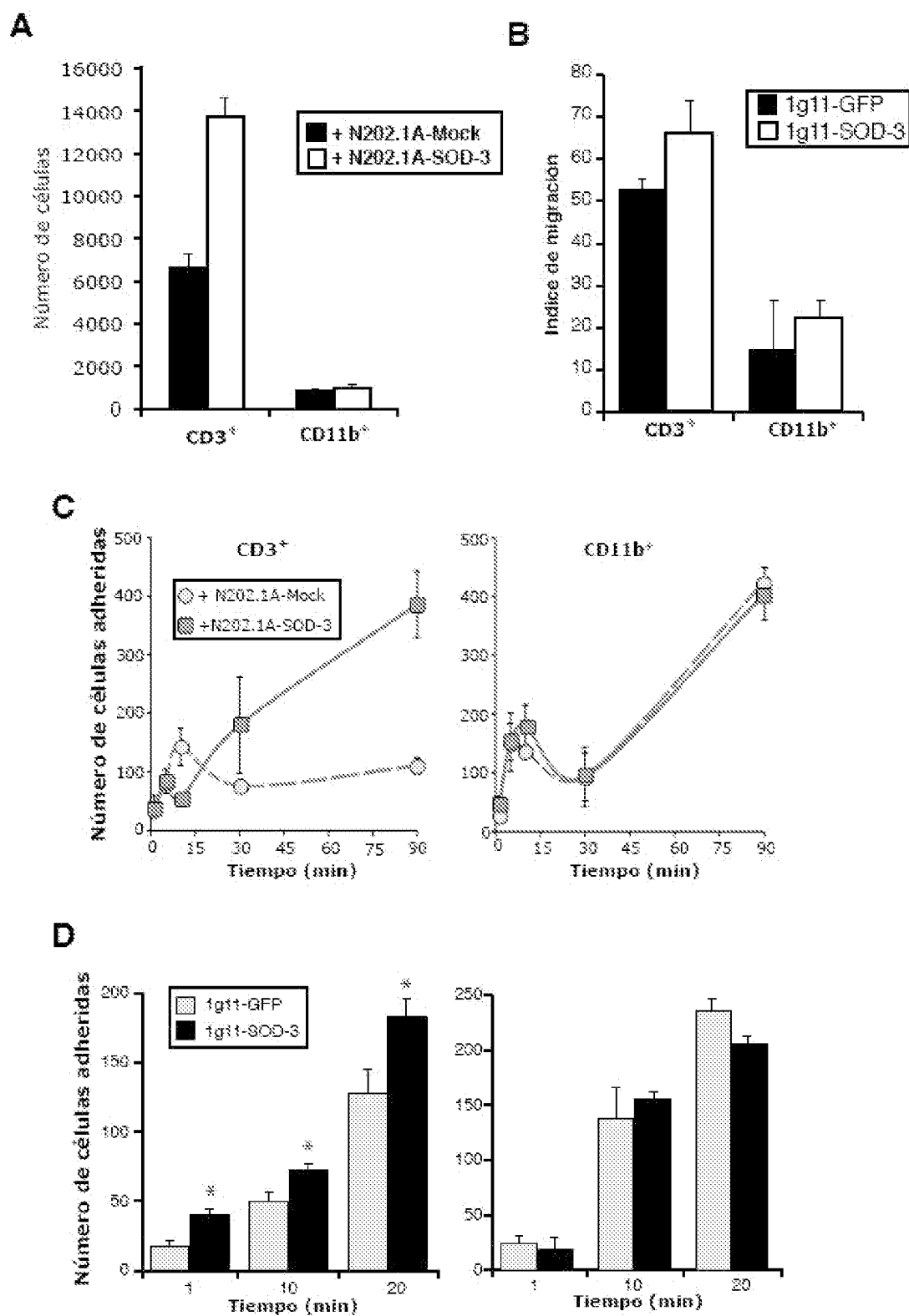


FIG. 3

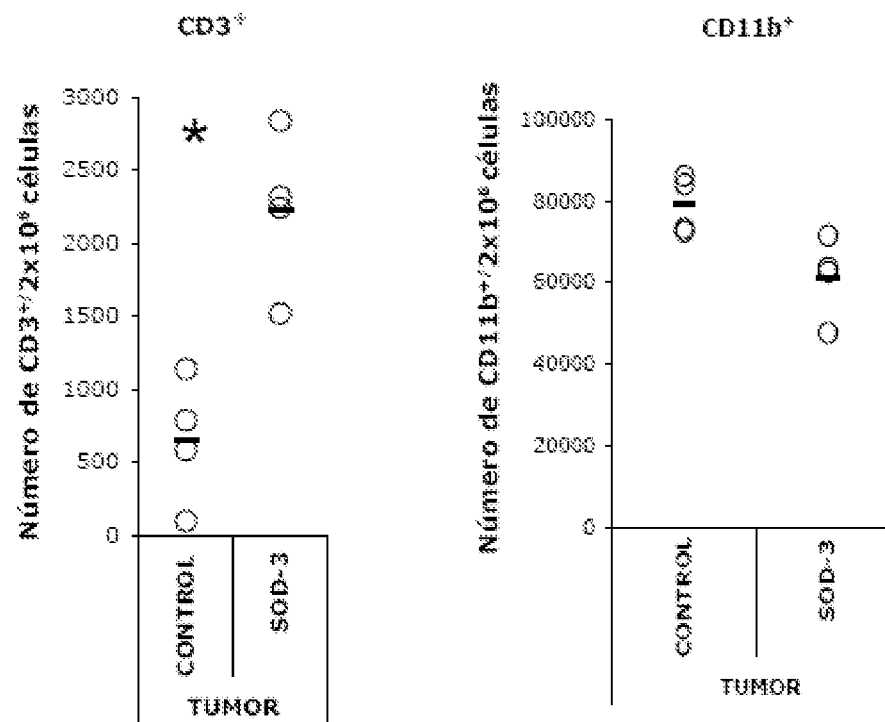


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031015

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.06.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20040001818 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER INC.) 01.01.2004, todo el documento.	1-3, 8-12
Y		4-7
Y	JP 2003-183176 A (WELLNESS MOVEMENT KK; COMBI CO; KYOWA ENG; SUNDORY KK; IZOSERU SA) 03.07.2003 (resumen) World Patents Index [bases de datos en línea]. Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 03.03.2011]. Recuperado de EPOQUENET. N° de acceso 2003-856737 [80].	4-7
A	D. VENKAT RATNAM et al. "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective" Journal of Controlled Release (mayo 2006) vol. 113; páginas 189-207; DOI 10.1016/j.jconrel.2006.04.015, todo el documento.	1-12
A	CHERYL L. FATTMAN et al. "Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine" Free Radical Biology & Medicine (2003) vol. 35; N° 3; Páginas 236-256; DOI 10.1016/S0891-5849(03)00275-2, todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.03.2011

Examinador
M. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/44 (01.01.2006)

C12N9/02 (01.01.2006)

A61P37/04 (01.01.2006)

A61P35/00 (01.01.2006)

A61P31/00 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C12N, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20040001818 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER INC.)	01.01.2004
D02	JP 2003-183176 A (WELLNESS MOVEMENT KK; COMBI CO; KYOWA ENG; SUNDORY KK; IZOSERU SA)	03.07.2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, es el uso de una composición farmacéutica que comprende una superóxido dismutasa extracelular (SOD3 o EC-SOD) para preparar un medicamento destinado a inmunoterapia. Dicho medicamento se destina a inmunoterapia adyuvante contra el cáncer y a inmunoterapia contra enfermedades infecciosas.

Novedad y Actividad Inventiva

El documento D01 divulga métodos y composiciones para la inhibición de la angiogénesis, la migración de células endoteliales o la proliferación de dichas células endoteliales (ver párrafos [0008], [0009], [0012], [0014], [0015], [0017] y [0018]). Las composiciones que divulga contienen inhibidores de la NADPH oxidasa como la superóxido dismutasa (ver párrafos [0020], [0021], [0043], [0044] y [0053]). Los métodos y composiciones divulgados son para el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de angiogénesis, como cáncer y diversos tipos de tumores (ver párrafos [0022] y [0056]). Este documento también divulga la posibilidad de usar dichos métodos y composiciones en combinación con otras composiciones o métodos para el tratamiento de dichas enfermedades, como por ejemplo con quimioterapia (ver párrafos [0058] y [0068]). La administración de las composiciones divulgadas puede ser oral o parenteral entre otras (ver párrafo [0059]).

La invención definida en las reivindicaciones 1-3 y 8-12 no difiere de la técnica conocida descrita en el documento D01 en ninguna forma esencial, ya que aunque las composiciones divulgadas en el documento D01 se refieren a la inhibición de la angiogénesis, de forma particular, y no a una inmunoterapia de forma más general, el resultado es el mismo, el uso de una composición que contiene EC-SOD para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, la invención según las reivindicaciones 1-3 y 8-12 se considera obvia para un experto en la materia. Por consiguiente, la invención según las reivindicaciones 1-3 y 8-12 no se considera que implique actividad inventiva.

En cuanto a las reivindicaciones 4-7, el documento D01 se considera el más próximo del estado de la técnica, y, como ya se ha indicado, divulga la relación ya conocida entre las enzimas superóxido dismutasa y las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer. La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la invención según las reivindicaciones 4-7, está en las enfermedades que pueden ser tratadas con la composición de la invención, que son un cáncer hematopoyético, concretamente un linfoma, y más concretamente un linfoma tímico y enfermedades infecciosas. Sin embargo, esta diferencia ya está divulgada en el documento D02 que divulga una composición estimuladora del sistema inmune para prevenir y tratar varias enfermedades inmunológicas y enfermedades infecciosas. La composición contiene beta-glucano, superóxido dismutasa, lípidos y proteínas, como ingredientes activos. Entre las enfermedades que se pueden prevenir y tratar con esta composición, se incluyen distintos tipos de cáncer como linfomas y leucemia y enfermedades infecciosas.

Por lo tanto, a partir de los documentos del estado de la técnica, sería obvio para un experto en la materia utilizar una composición que comprenda una superóxido dismutasa para preparar un medicamento destinado a tratar las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como son el cáncer y enfermedades infecciosas. Por consiguiente, las reivindicaciones 4-7 se considera que no implican actividad inventiva.

De acuerdo con las argumentaciones anteriormente establecidas, se considera que la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12 aunque nuevas según el art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, no se considera que implique actividad inventiva tal y como establece el art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.