

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 293**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2001 E 01104943 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **04.09.2002 EP 1236740**

54 Título: **Vacuna contra cánceres que están asociados con el oncogén HER-2/neu**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2013

73 Titular/es:

**BIO LIFE SCIENCE FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGSGES.M.B.H. (100.0%)
Kohlmarkt 3
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**ZIELINSKI, CHRISTOPH;
SCHEINER, OTTO;
JENSEN-JAROLIM, ERIKA;
BREITENEDER, HEIMO y
URSULA-WIEDERMANN**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 394 293 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra cánceres que están asociados con el oncogén HER-2/neu

5 La presente invención se refiere a una vacuna contra cánceres que están asociados con el oncogén HER-2/neu.

En los últimos años se está constatando en las naciones industrializadas occidentales un incremento continuo de los cánceres, que representa con ello una de las principales causas de muerte. Por ejemplo, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más extendido entre las mujeres, del cual están afectadas aproximadamente 10% de todas las mujeres en las naciones occidentales industrializadas.

Los procedimientos conocidos hasta ahora para la terapia de los cánceres ponen la mira ante todo en un diagnóstico precoz de la enfermedad y en métodos quirúrgicos o bien en una destrucción lo más selectiva posible de las células tumorales por quimio- o radioterapia. Estos procedimientos presentan el inconveniente de que, por una parte, no es posible una profilaxis eficaz contra la aparición de los cánceres y que, por otra parte, el tratamiento está asociado con efectos secundarios muy importantes para los pacientes.

Adicionalmente se sabe que en una multitud de tipos de cáncer como por ejemplo los cánceres de mama, ovario, intestino, pulmones y próstata se produce una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu (designada también como p185 o c-erbB2) como producto proteínico del oncogén HER-2/neu. La proteína HER-2/neu no sólo está ligada estrechamente al fenotipo maligno del tipo de cáncer, sino que puede estar asociada también con la agresividad del tipo de cáncer. La proteína HER-2/neu es una proteína transmembrana con un peso molecular relativo de 185 kd y tiene una longitud de aproximadamente 1255 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la proteína HER-2/neu, así como la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de DNA que codifica la misma se reproducen en el documento de Estados Unidos 5.869.445. Se hará referencia en la presente memoria al contenido publicado de este documento. La parte extracelular de la proteína HER-2/neu abarca la secuencia peptídica desde el aminoácido 1 al aminoácido 675.

En el documento de Estados Unidos 5.869.445 se publica un procedimiento para la estimulación de una respuesta inmune a la proteína HER-2/neu, en el cual se administra un polipéptido con la secuencia de aminoácidos 676-1255 de la proteína HER-2/neu.

Es por consiguiente finalidad de la presente invención proporcionar una vacuna contra cánceres en los cuales se produce una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, con cuya ayuda es posible evitar los inconvenientes de los métodos convencionales de tratamiento del cáncer, hacer posible una profilaxis eficiente de tales cánceres y proporcionar alternativas al procedimiento conocido por el documento de Estados Unidos 5.869.445.

La invención está basada en el descubrimiento de que puede conseguirse una vacuna de este tipo, cuando la misma contiene fragmentos de la parte extracelular de la proteína HER-2/neu como componentes activos.

Objeto de la presente invención es por tanto una vacuna contra cánceres que están asociados con el oncogén HER-2/neu, según la reivindicación 1.

Con la vacuna según la invención, es posible una inmunización activa contra cánceres que están asociados con el oncogén HER-2/neu. Por consiguiente, puede obtenerse una profilaxis contra estos cánceres. Adicionalmente, la vacuna según la invención puede emplearse también para la terapia de una enfermedad cancerosa ya establecida o concomitantemente con tratamientos convencionales del cáncer. Mediante el empleo de la vacuna según la invención pueden evitarse total o parcialmente los importantes inconvenientes descritos anteriormente de los métodos convencionales de tratamiento del cáncer.

La vacuna según la invención contiene un péptido constituido por las secuencias de los aminoácidos 544 a 560 y un péptido constituido por la secuencia de los aminoácidos 610 a 623 de la porción extracelular de la proteína HER-2/neu.

La secuencia del péptido que tiene las secuencias de los aminoácidos 544 a 560 de la porción extracelular de la proteína HER-2/neu es: CRVLQGLPREYVNARHC (secuencia 1). La secuencia del péptido que tiene las secuencias de los aminoácidos 610 a 623 de la porción extracelular de la proteína HER-2/neu es: YMPIWKFPDEEGAC (secuencia 2). Las secuencias se reproducen en el protocolo de secuencias como número de secuencia 1 o número de secuencia 2.

La figura 1 muestra una transferencia Western de la inmunoprecipitación de un lisado de células SKBR-3 que sobreexpresan HER-2/neu con sueros de ratones que se trataron con la vacuna según la invención, y ratones sin tratar para la detección de la respuesta inmune después de administración de la vacuna.

La figura 2 muestra datos ELISA de los sueros de ratones que se trataron con la vacuna según la invención, y ratones sin tratar para la detección de la respuesta inmune después de la administración de la vacuna.

Los péptidos según la invención pueden combinarse también con otros péptidos o polipéptidos o con grupos químicos adicionales como grupos glicosilo, lípidos, fosfatos, grupos acetilo o análogos, siempre que los mismos no influyan desfavorablemente en su eficacia.

5 La vacuna según la invención contiene en cualquier caso los péptidos, es decir, fragmentos de la parte extracelular de la proteína HER-2/neu, con los números de secuencia 1 y 2.

10 En una forma preferida de realización, los péptidos se conjugan con un vehículo inmunógeno. Tales vehículos pueden ser macromoléculas de cualquier clase. La conjugación con un vehículo tiene como consecuencia que la inmunogenicidad de la vacuna aumenta.

Preferentemente, los péptidos se conjugan con hemocianina de lapa bocallave (KLH) o toxoide del tétanos (TT).

15 La conjugación de los péptidos con el material vehículo puede realizarse de manera discrecional, por ejemplo por tecnología genética o por vía química, es decir que la combinación del vehículo y el grupo funcional tiene lugar por una reacción química. Por la vía de la tecnología genética, el acoplamiento de la molécula del vehículo proteínico con el péptido puede tener lugar de tal manera que se incorpora en un sistema de expresión una secuencia de DNA o RNA codificante de la secuencia total del conjugado, por la cual puede expresarse el conjugado total.
20 Evidentemente, esta forma de conjugación puede emplearse sólo en el caso en que el conjugado total es también una molécula de proteína.

Preferentemente, los péptidos se conjugan con el vehículo por vía química. Es decir, que la combinación del péptido y el vehículo con el conjugado se realiza por procedimientos químicos.

25 Los péptidos pueden conjugarse con el vehículo como mono-, di-, tri-, u oligómeros. Tales conjugaciones se describen por ejemplo en el documento de Th. H. Turpen, S. J. Reinl, Y. Charoenvit, S.L. Hoffman, V. Fallame en Bio/Technology, 1995, volumen 13, páginas 53 a 57 en el ejemplo de la conjugación de epítopes con vehículos macromoleculares. Los procedimientos descritos pueden trasladarse análogamente a la producción de los
30 conjugados para la vacuna según la invención.

Si la conjugación de un conjugado peptídico di- u oligómero se realiza por la vía del procedimiento de tecnología genética descrito anteriormente, entonces los segmentos de DNA o RNA codificantes de los péptidos se integran una o varias veces dispuestos sucesivamente en la secuencia de DNA o RNA codificante del vehículo. De este
35 modo, se consigue la expresión de conjugados peptídicos di- u oligómeros.

Los mono- u oligómeros de los péptidos pueden conjugarse con el vehículo tanto en forma simple como en forma múltiple, es decir, de modo que se adhieren a un vehículo una o más moléculas de péptido.

40 La vacuna según la invención puede aplicarse de diversas maneras. La administración de la vacuna que contiene en sí misma los péptidos puede realizarse por ejemplo por vía subcutánea o por ingestión oral de la vacuna en forma de cápsulas o tabletas.

45 La vacuna según la invención puede producirse de diversas maneras por vía de tecnología genética o vía química. Tales procedimientos se describen por ejemplo en el documento de Estados Unidos 5.869.445.

Un ejemplo de un procedimiento de producción por tecnología genética es la manipulación de microorganismos como E. coli. Estos se manipulan de tal manera que los mismos expresen los péptidos como tales o el conjugado total constituido por el péptido y el vehículo acoplado al mismo.

50 Preferentemente, los péptidos se producen sintéticamente por vía química. En una forma de realización preferida, ello se realiza con ayuda del método de síntesis en fase sólida. Adicionalmente, se prefiere que el péptido producido sintéticamente se combine por vía química con un vehículo como KLH ó TT.

55 La vacuna según la invención puede emplearse para tratamiento profiláctico o agudo de humanos y animales que pueden desarrollar tipos de cáncer asociados con el oncogén HER-2/neu.

60 En lo que sigue se describe una forma de realización de la vacuna según la invención, un procedimiento para su producción, así como métodos para la detección de su eficacia en un ejemplo de realización.

Ejemplo

65 Se produjeron los péptidos con los números de secuencia 1 y 2 y se conjugaron con hemocianina de lapa bocallave (KLH).

Los péptidos se sintetizaron por síntesis en fase sólida según la estrategia de grupos protectores FMOC. La conjugación tuvo lugar a través de la función tio de la cisteína C-terminal en la KLH modificada con maleimida.

Inmunización

5 Para la detección de la eficacia de la vacuna según la invención se trataron dos grupos de cinco ratones cada uno de la manera siguiente:

10 Se administraron al primer grupo (grupo de ensayo) los dos péptidos, con los números de secuencia 1 y 2, conjugados en cada caso con KLH, así como el adyuvante Gerbu. Cada inyección contenía sendas porciones de 100 µg de cada conjugado en un volumen de 100 µl mezclado con 100 µl de adyuvante Gerbu, es decir en total 200 µl de solución de antígeno por inyección. Los ratones de control se trataron con 200 µl de una mezcla de 100 µl de agua con 100 µl de adyuvante Gerbu. La vacuna se administró por vía subcutánea en el pliegue del codillo.

15 El adyuvante Gerbu es una formulación adyuvante, que está basada en N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, con cloruro de dimetildioctadecilamonio y un complejo zinc-L-prolina como agentes sinérgicos. Este adyuvante puede adquirirse de la firma Gerbu-Biotechnik GmbH, Gaiberg, Alemania.

Esquema de inmunización

20 Después de la sensibilización, se realizaron 3 refuerzos con sendos intervalos de 3 semanas. Siete días después del último refuerzo se sacrificaron los animales. Se extrajo sangre, y se les extirparon el bazo, el hígado, los pulmones y los riñones.

25 Como métodos para la detección de la inducción de una respuesta inmune específica de los péptidos y de HER-2/neu en los ratones se emplearon los tres siguientes:

1. Detección de una activación de las células T en un ensayo de proliferación

30 En este caso, se estimularon en primer lugar las células del bazo obtenidas de los ratones inmunizados con los péptidos empleados para la inmunización que tenían los números de secuencia 1 y 2. Como medida de la proliferación es válida la incorporación de ³H-timidina, que puede cuantificarse. Se determinan los impulsos por minuto (cpm). Como índice de estimulación (SI) se designa el cociente de cpm (con las células estimuladas por el péptido respectivo)/cpm (células no estimuladas). Se incubaron en placas de 96 pocillos 2 x 10⁵ células por cavidad
35 durante 5 días con los dos polipéptidos que tenían el número de secuencia 1 ó 2, en una concentración de 20 µg/ml. Después de este tiempo, se añadió ³H-timidina y se midió la actividad incorporada al cabo de 18 horas de incubación.

El procedimiento descrito anteriormente produjo el resultado siguiente:

40 El índice de estimulación en el grupo inmunizado (grupo de ensayo) variaba desde 1,0 a 1,6 para el péptido de la secuencia 1 y desde 1,5 a 2,0 para el péptido de la secuencia 2.

45 El índice de estimulación en el grupo de control tenía en todos los casos el valor 1,0, es decir no se constató proliferación alguna de las células.

2. Detección de los anticuerpos específicos de HER-2/neu por inmunoprecipitación

50 Dado que no existe proteína HER-2/neu alguna obtenible comercialmente, se empleó un lisado celular de células del carcinoma mamario SKBR-3, que sobreexpresan HER-2/neu. Los sueros de ratón se incubaron con el lisado celular. En presencia de anticuerpos específicos en el suero, se precipita HER-2/neu del lisado celular. El inmunocomplejo formado puede aislarse con ayuda de proteína A + G-agarosa (anticuerpo combinado). Estos complejos se separaron a continuación por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La HER-2/neu precipitada se detectó con ayuda de un anticuerpo anti-HER-2/neu
55 (Zymed) obtenible comercialmente. En este caso se visualiza la banda respectiva en la membrana por una coloración. El método aquí descrito sirve como detección cualitativa.

El análisis de los sueros arrojó el resultado siguiente:

60 En la figura 1 se muestra la inmunoprecipitación del lisado de las células SKBR-3 con sueros de ratón del grupo de ensayo y el grupo de control. En todos los sueros del grupo de ensayo se detectaron los anticuerpos específicos anti-HER-2/neu. Todos los sueros del grupo de control arrojaron inequívocamente un resultado negativo.

3. Detección de los anticuerpos específicos HER-2/neu por ELISA

- En este caso se recubrieron en primer lugar las cavidades de una placa ELISA de 96 pocillos con herceptina (anticuerpo anti-HER-2/neu de Genentech Inc.). Los puntos de fijación inespecíficos se bloquearon con 2% de leche.
- 5 Los pocillos se incubaron a continuación con las fracciones de membrana de células SKBR-3, que sobreexpresan la proteína HER-2/neu. Para cuantificar el fondo inespecífico, se incubaron pocillos de control con fracciones de membrana de células HTB132 que no expresan en absoluto la proteína HER-2/neu. En ambos casos se saturaron (bloquearon) subsiguientemente los puntos de fijación inespecíficos con 2% de leche.
- 10 En el paso siguiente, los sueros de los ratones inmunizados (ratón 16 a ratón 20) y los del grupo de control (ratón 1 a ratón 5) que se habían obtenido antes y después de la inmunización, se pipetearon en los pocillos en una dilución de 1:100. Para cada suero se emplearon 2 pocillos con membranas SKBR-3 y 2 pocillos con membranas HTB 132. Si existen en el suero anticuerpos específicos contra la proteína HER-2/neu, entonces los mismos se fijan al antígeno. Estos anticuerpos pueden ser detectados a continuación con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP). La HRP produce una reacción coloreada con el sustrato. El resultado de esta reacción coloreada puede medirse con el fotómetro. Para ello, se determina la absorción a 450 nm y se corrige contra el fondo de 650 nm (valor DO). Como resultado se considera para cada suero la diferencia del valor DO (densidad óptica) de los 2 pocillos incubados con lisado SKBR-3 menos el valor DO de los 2 pocillos incubados con lisado HTB132.
- 15
- 20 Este método permite una comparación del título de anticuerpos en los sueros.
- Se evaluaron sueros de todos los ratones antes y después de la vacunación. En 4 de 5 ratones del grupo de ensayo pudo comprobarse un aumento inequívoco de los valores DO después de la inmunización. Los valores DO obtenidos del grupo de control no acusaban variación alguna del título de anticuerpos.
- 25

Resultado histopatológico

- 30 Los pulmones, el hígado y los riñones se examinaron histopatológicamente con respecto a reacciones autoinmunes. En todos los casos se evaluaron los órganos sin hallazgo alguno.

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Bio Life Science Forschungs- und Entwicklungsges.

<120> Vacuna contra cánceres que están asociados con el oncogén HER-2/neu

<130> K 36897

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His
 1 5 10 15

Cys

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

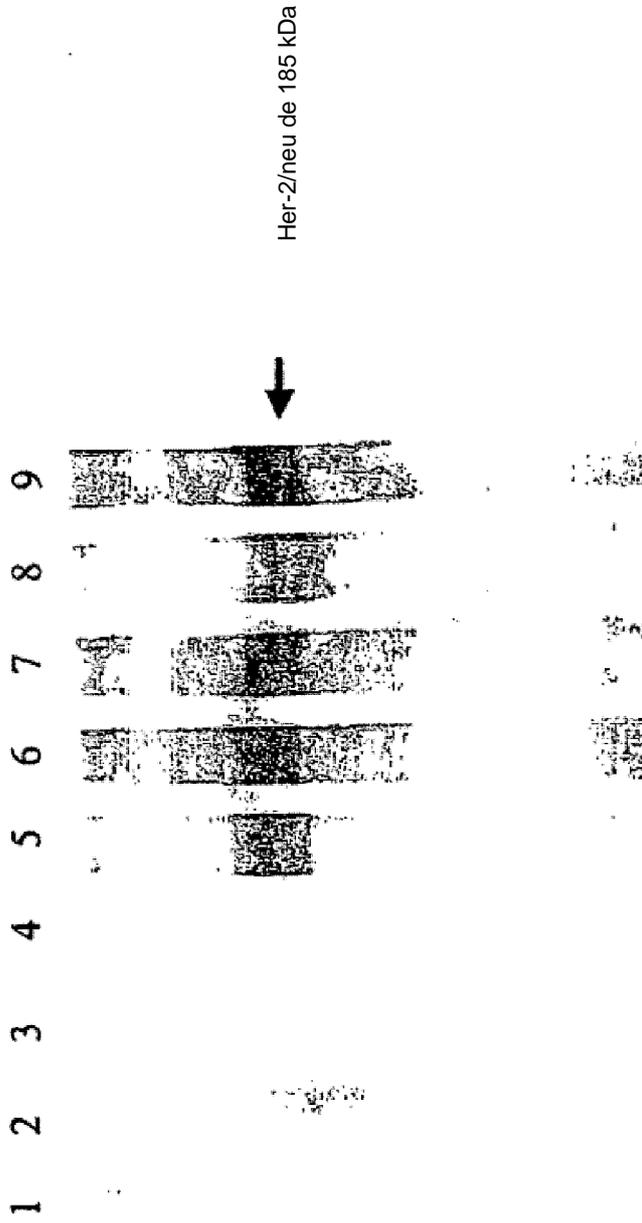
<400> 2

Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna contra cánceres, en los cuales se produce una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, **caracterizada porque** contiene un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos (secuencia No. 1) CRVLQGLPREYVNARHC, como aparece en la parte extracelular de la proteína HER-2/neu, y un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos (secuencia No. 2) YMPIWKFPDEEGAG, como aparece en la parte extracelular de la proteína HER-2/neu.
- 10 2. Vacuna, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** los péptidos están conjugados a un vehículo inmunógeno.
3. Vacuna, según la reivindicación 2, **caracterizada porque** como vehículo se emplea hemocianina de lapa bocallave (KLH) o toxoide del tétanos (TT).
- 15 4. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizada porque** la conjugación se realiza por vía química.
- 20 5. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada porque** los péptidos están conjugados con el vehículo como monómero, dímero, trímero u oligómero.
6. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizada porque** los péptidos están conjugados con el vehículo una sola vez o varias veces.

Transferencia Western: Inmunoprecipitación de un lisado de células SKBR-3 con sueros de ratón



Pista 1: Control de tampón

Pistas 2-4: Ratones de control

Pistas 5-9: Ratones inmunizados con secuencia 1 + secuencia 2

Fig. 1

Datos ELISA de los sueros de ratones del grupo de control y de los ratones inmunizados

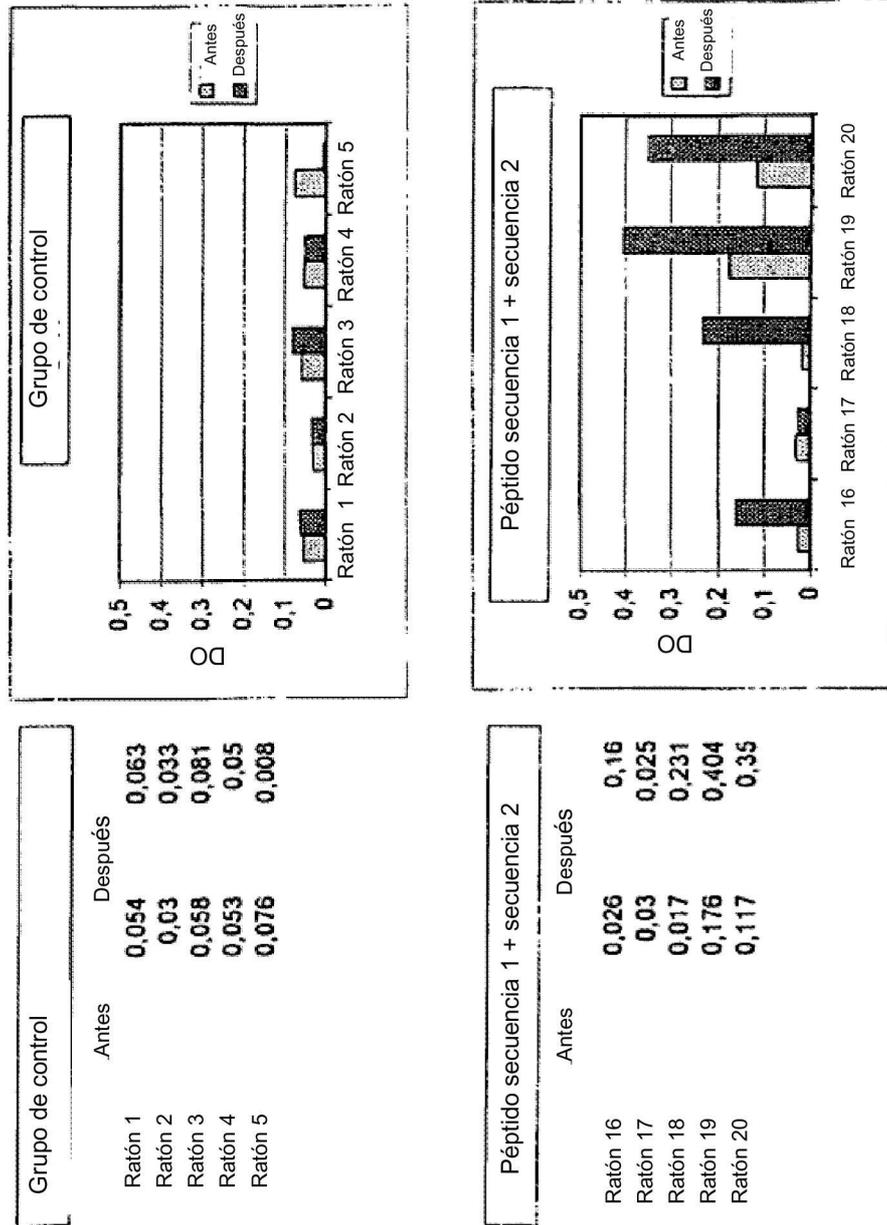


Fig. 2