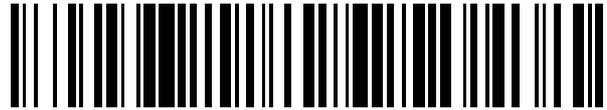


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 274**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2000 E 00985439 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1237573**

54 Título: **Utilización de proteínas inmunógenas inmunosupresoras o angiogénicas desactivadas para la producción de IgA secretoras**

30 Prioridad:

15.12.1999 FR 9915825

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

10.12.2013

73 Titular/es:

**NEOVACS (100.0%)
59, AVENUE VICTOR HUGO
75116 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

ZAGURY, DANIEL

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 433 274 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

Utilización de proteínas inmunógenas inmunosupresoras o angiogénicas desactivadas para la producción de IgA secretoras.

5 La presente invención se refiere a la utilización de una proteína Tat del VIH-1 que procede de células infectadas por un virus o de células inmunitarias, de un fragmento de dicha proteína o también de una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína o fragmento, para la preparación de un medicamento destinado a conferir a un paciente una inmunidad mucosal basada en la secreción de IgA secretoras.

10 Se buscan siempre unos compuestos activos para luchar contra el cáncer que es la principal plaga médica de nuestra época. Numerosas terapias se han desarrollado con un éxito variable ya que existe todavía una mortalidad importante. Estas terapias han sido en primer lugar la exéresis quirúrgica para los tumores sólidos, la radioterapia y la quimioterapia. Estas terapias parecen ser insuficientes en numerosos cánceres para los cuales no se ha observado ningún éxito clínico, lo cual indica una prolongación importante de la supervivencia de los pacientes o su curación total.

15 Los cánceres son proliferaciones de células que pueden migrar después en el organismo para formar metástasis. Es conocido que el sistema inmunitario de un individuo normal elimina regularmente las células cancerígenas nacientes (concepto de inmunovigilancia), y que la formación de un cáncer está asociada 1) al escape del sistema de vigilancia inmunitario local y después a un periodo avanzado del cáncer, a una inmunosupresión sistémica y 2) a una proliferación de las células endoteliales vasculares que aseguran la aportación nutritiva de las células tumorales (neoangiogénesis).

20 La mayoría de los agentes anticancerígenos (quimioterapia, radioterapia) utilizados en la actualidad luchan contra la replicación de las células cancerígenas. Estos agentes no tienen por objetivo el entorno particular necesario para la proliferación de las células cancerígenas, caracterizado al mismo tiempo por la ausencia de actividad local (paracrina) de las células inmunitarias antitumorales (escape inmunitario) y por la aparición de una vascularización intratumoral (neoangiogénesis).

25 Por ello, recientemente, se han introducido nuevos enfoques terapéuticos. Algunos tienen como objetivo estimular el sistema inmunitario antitumor por terapia celular o por la activación de genes que codifican para unas proteínas que estimulan la respuesta inmunitaria (terapia génica) o también inmunizando directamente contra unos antígenos, identificados como específicos o asociados, del tumor de tipo MAGE (vacunación). Otros tienen como objetivo luchar contra la neoangiogénesis, utilizando unos antimetabolitos que destruyen las células endoteliales (Judah Folkman).

30 En este nuevo contexto, se debe señalar que De Bruijn *et al.*, (Cancer Res (1998) 58, páginas 724-731) han descrito la utilización de proteínas E6 y E7 nativas para inducir una respuesta celular citotóxica (CTL) en ratones para protegerlos contra la implantación de células tumorales.

35 Ahora bien, la solicitante ha descubierto de manera sorprendente, después de largas investigaciones, que unos factores inmunosupresores o angiogénicos con acción paracrina son inducidos por los tumores. Estos factores que son solubles pueden, por un lado, impedir localmente que las células del sistema inmunitario actúen eficazmente, incluso si se les estimula (inmunosupresión) y pueden, por otro lado, asegurar la nutrición de las células cancerígenas, activando la proliferación de las células endoteliales (angiogénesis).

40 El fenómeno de escape a las defensas inmunitarias celulares del hospedante por inducción de su parálisis *in situ* es una estrategia utilizada por numerosos cánceres y es necesario para su supervivencia. Inicialmente, la inmunosupresión permanece localizada a nivel del tumor, ya que el individuo es todavía capaz de defenderse contra las otras agresiones tales como infecciones. Sin embargo, en un estado más tardío, esta inmunosupresión puede extenderse, generalizarse, así como lo demuestran la diseminación de metástasis y la gran vulnerabilidad de la persona con cáncer frente a las infecciones, incluso fuera de los efectos debilitantes debidos a la quimioterapia o radioterapia. En resumen, este escape al control del sistema inmunitario se debe a una parálisis del sistema inmunitario (inmunosupresión), que le impide funcionar normalmente. Esta inmunosupresión utiliza unos factores paralizantes, que son producidos por las células cancerígenas o su entorno. La parálisis local de las células del sistema inmunitario o inmunosupresión representa por lo tanto un arma principal de las células cancerígenas que les permite escapar al sistema inmunitario del hospedante. Así, unas proteínas liberadas por las células infectadas actúan como verdaderas toxinas sobre las células inmunitarias de los alrededores, las desajustan y bloquean *in situ* (de manera paracrina) las células del sistema inmunitario, protegiendo las células infectadas.

45 El fenómeno de escape a las defensas inmunitarias celulares del hospedante por inducción de su parálisis *in situ* es una estrategia utilizada por numerosos cánceres y es necesario para su supervivencia. Inicialmente, la inmunosupresión permanece localizada a nivel del tumor, ya que el individuo es todavía capaz de defenderse contra las otras agresiones tales como infecciones. Sin embargo, en un estado más tardío, esta inmunosupresión puede extenderse, generalizarse, así como lo demuestran la diseminación de metástasis y la gran vulnerabilidad de la persona con cáncer frente a las infecciones, incluso fuera de los efectos debilitantes debidos a la quimioterapia o radioterapia. En resumen, este escape al control del sistema inmunitario se debe a una parálisis del sistema inmunitario (inmunosupresión), que le impide funcionar normalmente. Esta inmunosupresión utiliza unos factores paralizantes, que son producidos por las células cancerígenas o su entorno. La parálisis local de las células del sistema inmunitario o inmunosupresión representa por lo tanto un arma principal de las células cancerígenas que les permite escapar al sistema inmunitario del hospedante. Así, unas proteínas liberadas por las células infectadas actúan como verdaderas toxinas sobre las células inmunitarias de los alrededores, las desajustan y bloquean *in situ* (de manera paracrina) las células del sistema inmunitario, protegiendo las células infectadas.

50 Los tumores malignos están caracterizados por la presencia de una vascularización importante, que asegura un flujo de sangre necesario para la nutrición de las células cancerígenas. Esta vascularización se realiza mediante la activación de las células endoteliales vasculares inducidas en contacto con las células tumorales (neoangiogénesis). Los trabajos de Judah Folkman han demostrado recientemente que el control de la neoangiogénesis tumoral podía representar un arma eficaz decisiva contra los cánceres (Folkman J., Semin. Cancer Biol., 1992, 3 (2): 65-71).

55 En este contexto fisiopatológico, la solicitante ha descubierto, después de largas investigaciones, en el caso del ATL,

- del cáncer del cuello uterino, y del sarcoma de Kaposi, tres proteínas implicadas en una inmunosupresión local a nivel del tumor: se trata de la proteína Tax de HTLV 1, de la proteína E7 del papilomavirus, y de la proteína Tat del VIH-1 en el sarcoma de Kaposi. En este último caso, existiría también como agente etiológico un virus del herpes (el HHV8), que explicaría que el sarcoma de Kaposi aparece también en sujetos no infectados por el VIH-1. Se ha implicado a Tat en el sarcoma de Kaposi, pero sin que los investigadores identifiquen su papel generador de inmunosupresión local que favorece la generación de sarcomas de Kaposi. De manera interesante, la solicitante ha descubierto que algunas de estas proteínas inmunosupresoras, tales como la proteína Tat del VIH-1 y la proteína E7 de HPV (cepas 16 y 18) también tienen efectos activadores sobre las células endoteliales vasculares.
- Para luchar contra estos factores inmunosupresores y/o angiogénicos, la solicitante ha propuesto inducir por vía general unos anticuerpos específicos dirigidos contra estos factores extracelulares. Así, ha descrito la administración de las proteínas citadas anteriormente por las dos vías convencionales de administración de las vacunas, a saber la vía oral y la vía inyectable.
- Así, en una solicitud de patente anterior (WO 96/27389, Zagury *et al.*), la solicitante ha demostrado cómo bloquear mediante unos anticuerpos específicos los factores solubles liberados por las células tumorales o infectadas por un virus. Por "factores solubles" se entienden unos factores (en general unas proteínas) sintetizados por estas células y liberados en el medio extracelular o bien mediante transporte activo, o bien mediante difusión pasiva. Los factores extracelulares citados anteriormente pueden actuar *in situ* o bien inhibiendo la respuesta celular inmunitaria, que incluye la activación de los linfocitos T citolíticos (CTL), o bien perturbando la red citoquinica, o bien satisfaciendo mediante la neoangiogénesis las necesidades nutritivas del tumor. Estos factores extracelulares pueden ser de origen celular (citoquinas) o, para los cánceres inducidos por virus o las enfermedades virales, unas proteínas virales, principalmente unas proteínas de regulación, presentes en el medio extracelular.
- Ha descrito en particular unos medios que permiten obtener, en el medio circulante, unos anticuerpos de clase IgG dirigidos específicamente contra unos factores deletéreos, por ejemplo inmunosupresores y/o angiogénicos, siendo dichos anticuerpos susceptibles de bloquear estos factores y neutralizar sus efectos sobre las células inmunitarias y/o endoteliales. Estos anticuerpos específicos de clase IgG han sido, o bien inducidos por inmunización activa (vacunación) dirigida contra las proteínas en particular los factores solubles previamente identificados, o bien administrados pasivamente (inmunización pasiva). Los anticuerpos circulantes, presentes en el medio extracelular, combinándose con estas proteínas, pueden neutralizar sus efectos indeseables.
- La solicitante ha identificado en por lo menos tres cánceres viro-inducidos dichos factores solubles: el sarcoma de Kaposi (VIH-1), el cáncer del cuello uterino (HPV) y la leucemia ATL (HTLV-1 y -2). Estos 3 factores, todos de origen viral, son respectivamente la proteína Tat del VIH-1, la proteína E7 del HPV y la proteína Tax del HTLV-1.
- Numerosos cánceres son inducidos por unos virus como el VIH-1 responsable del sarcoma de Kaposi y de otros cánceres, el HPV origen del cáncer del cuello uterino, el HBV y el EBV asociados, respectivamente, al hepatoma y a la enfermedad de Burkitt.
- La enfermedad del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) debida al VIH-1 y caracterizada por una inmunosupresión celular generalizada, puede manifestarse por el sarcoma de Kaposi, cáncer vascular, o por otras formas de cáncer entre las cuales, algunas leucemias o linfomas.
- La inmunosupresión celular observada en esta enfermedad que favorece la aparición de estos cánceres está inducida por la proteína Tat de regulación del VIH-1 que, si bien no pertenece a la estructura propia del virus, es liberada por las células infectadas en el medio extracelular. Bajo esta forma extracelular, la proteína Tat, que actúa como verdadera toxina viral, ejerce un efecto inmunosupresor sobre las células inmunitarias vecinas (Zagury D. *et al.*; PNAS, 1998, 95: 3851-56). Además, a nivel del sarcoma de Kaposi, se ha demostrado que la proteína Tat asociada a las citoquinas inflamatorias (IFN α , Il-1, TNF α) y al BFGF, favorecía la neoangiogénesis que forma el tumor (Ensoli B. J. *Virology*. 1993, 67: 277-287).
- De hecho, debido a sus propiedades inmunosupresoras y angiogénicas, la proteína Tat, presente en el medio extracelular, favorece en la enfermedad SIDA, no sólo el desarrollo del sarcoma de Kaposi, causado por el virus HHV8, sino también otros cánceres, que incluyen linfomas o leucemias.
- El cáncer epitelial del cuello uterino está provocado por ciertas cepas del virus HPV (cepas 16 y 18). Las células cancerígenas de este cáncer expresan sólo 2 proteínas de aparición precoz de este virus, la proteína E6 y la proteína E7 que, ambas, tienen efectos sobre los factores reguladores del ciclo celular de la célula cancerígena. Por otra parte, la proteína E7, presente en el medio extracelular, explica la aparición en los enfermos de bajos porcentajes de anticuerpos anti-E7. La proteína E7 extracelular, así como la proteína Tat extracelular, puede actuar localmente como una toxina sobre las células estromales (células linfoides o células endoteliales) del tumor.
- Esta proteína E7 ha mostrado en efecto, experimentalmente, unas propiedades inmunosupresoras y angiogénicas. La inmunosupresión inducida por la proteína E7 se ha caracterizado por la inhibición de la proliferación de las células T estimuladas por el PPD o el toxoide tetánico, la inhibición de la proliferación de las células T estimuladas

por unas células alogénicas, la sobreproducción de IFN α (citoquina inmunosupresora) por las células que presentan el antígeno (APC). El poder angiogénico de la toxina E7 sobre los cultivos de células endoteliales que proceden del cordón umbilical de recién nacidos y pretratadas por la proteína E7 ha sido sugerido por las observaciones siguientes: formación de nidos celulares numerosos, visibles en contraste de fase; identificación por Facs de marcadores CAM (ICAM y VCAM) en el seno de las células endoteliales y modificación del citoesqueleto de las células en cultivo observadas por inmunofluorescencia y alteración de la expresión del monóxido de nitrógeno sintetasa inducible por las células endoteliales en cultivo, en presencia de la proteína E7. Como se verá en los ejemplos de manera más decisiva, el poder angiogénico de la toxina E7 puede ser demostrado directamente *in vitro* por la activación de las células endoteliales vasculares que proceden de líneas celulares o de células recientes de cordón umbilical de recién nacidos inducidas por la proteína E7 del HPV (cepa 16).

Prosiguiendo estas investigaciones, la solicitante se ha dado cuenta de que cuando se trata de un cáncer que afecta a una mucosa epitelial tal como el cáncer del cuello uterino o también una infección viral que afecta a las mucosas genitales, vaginales, intestinales o rectales, era importante que la reacción inmunitaria destinada a luchar contra la enfermedad pueda actuar localmente, en el seno de estas mucosas para bloquearla en un estado precoz.

Parecía por lo tanto deseable inducir una reacción inmunitaria mucosal, que genera unos anticuerpos de clase IgA secretores.

La inducción de anticuerpos dirigidos contra los factores virales extracelulares tales como las proteínas Tat, E7 o Tax, como unas toxinas sobre las células estromales linfoides o endoteliales intratumorales, implica la preparación de inmunógenos biológicamente desprovistos de los efectos deletéreos de la proteína nativa. Dichos inmunógenos o los anticuerpos específicos que inducen pueden, gracias a sus propiedades, combatir la inmunosupresión y/o la angiogénesis presente(s) en el seno de los tumores, y por lo tanto ser útiles como medicamentos anticancerígenos. Pero la utilización de moléculas de ADN permite también alcanzar este objetivo.

La presente solicitud tiene principalmente por objeto la utilización, en combinación con un adyuvante de inmunidad mucosal, de la proteína Tat del virus VIH-1, tal como se define en la reivindicación 1.

La presente solicitud tiene asimismo por objeto la utilización:

- de un producto obtenido a partir de la proteína natural Tat del VIH-1, que se modificará mediante cualquier técnica conocida, como por vía química, física (de la cual, la forma galénica) o por ingeniería genética, de tal manera que sus propiedades inmunosupresoras están inactivadas en por lo menos el 70%, preferentemente en por lo menos el 90%, en particular en por lo menos el 95%, por un tratamiento químico, físico y/o por construcción genética apropiada, incluso por una presentación apropiada, o
- de una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína inactivada por mutación o a dicho fragmento inactivo, que representa la versión toxoide de las vacunas genéticas (vacunas de ADN).

para la obtención de un medicamento destinado a conferir a un paciente una inmunidad mucosal, basada en la secreción de anticuerpos de clase IgA secretora.

Tiene asimismo por objeto la utilización de un anticuerpo de clase IgA secretora contra una proteína inmunopatogénica, en particular inmunosupresora o angiogénica de acción local inducida por una célula infectada por un virus, para la obtención de un medicamento destinado a una utilización como agente anti-inmunosupresión local y/o como agente anti-angiogénico de acción local.

Ya que los cánceres pueden proliferar gracias a la inmunosupresión local evocada anteriormente y a la angiogénesis, los productos anteriores encuentran en parte su uso para la obtención de un medicamento destinado a su utilización como anticancerígenos.

La proteína natural citada anteriormente se caracteriza porque es una proteína inicialmente inmunosupresora y/o angiogénica de acción local inducida por células infectadas por un virus o un fragmento de esta proteína.

Por ello, la presente invención tiene por objeto la utilización de la proteína Tat del VIH-1 que procede de células infectadas por un virus o también de un fragmento inactivo de esta proteína, siendo dicha proteína una proteína inicialmente inmunosupresora y/o angiogénica de acción local, cuyas propiedades se vuelven inactivas en por lo menos el 70%, preferentemente en por lo menos el 90%, en particular en por lo menos el 95%, mediante un tratamiento físico y/o químico, tal como una formolación, una carboxamidación, una carboximetilación, una maleimidación o una oxidación por barboteo de oxígeno, por recombinación genética o también por un acondicionamiento adyuvante, conservándole dicho tratamiento la propiedad de ser reconocida por unos anticuerpos dirigidos contra dicha proteína, y conservándole unas propiedades inmunógenas suficientes para generar anticuerpos que neutralizan o que bloquean dicha proteína nativa, o también la utilización de una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína inactivada por mutación o a dicho fragmento inactivo, para la obtención de un

medicamento destinado a conferir a un paciente una inmunidad mucosal basada en la secreción de anticuerpos de clase IgA.

5 Por "agente anti-inmunosupresión o anti-angiogénico" se entiende que el agente puede tener uno, otro o los dos efectos.

Por "proteína inicialmente inmunosupresora y/o angiogénica de acción local" se entiende que la proteína nativa, es decir antes de la inactivación, produce uno, otro o los dos efectos.

10 Las proteínas desactivadas o fragmentos inactivos de la presente invención, a veces denominados a continuación "proteínas inactivadas" o "toxoides", o moléculas de ADN que generan la proteína inicialmente inmunosupresora y/o angiogénica de acción local inactivada por mutación y por ello, que presenta el toxoide por la vacunación ADN (versión toxoide de las vacunas genéticas a base de ADN) permiten luchar contra los cánceres mediante un enfoque complementario de los de la técnica anterior, y específico, que tiene como objetivo la parálisis del sistema
15 inmunitario y/o también la angiogénesis inducida(s) por las sustancias extracelulares producidas localmente en el entorno de las células cancerígenas. Esta parálisis inmunitaria y/o la angiogénesis constituyen una verdadera barrera protectora y/o una fuente nutritiva para el tumor.

20 Las proteínas desactivadas, fragmentos o moléculas de ADN según la presente invención permiten luchar en primer lugar contra estos factores proteicos inmunosupresores y/o angiogénicos, por formación mucosal de anticuerpos de clase IgA contra estas proteínas y en particular contra estos factores proteicos solubles para permitir que el sistema inmunitario actúe eficazmente y/o para bloquear la neoangiogénesis, por lo tanto en el lugar mismo de entrada de la infección o del asiento de la enfermedad.

25 Es importante utilizar el factor proteico extracelular deletéreo en una forma en particular física, química y/o genéticamente modificada (inactivada) y no nativa (o natural) con el fin de que ya no ejerza sus efectos nocivos (parálisis paracrina del sistema inmunitario o angiogénesis local).

30 Los tratamientos físicos pueden ser realizados mediante calor, radiaciones UV, rayos X o el contacto con una atmósfera rica en O₂. Estos tratamientos físicos que generan modificaciones intramoleculares entre radicales químicos (grupos tiol por ejemplo) pueden de manera apropiada cambiar la conformación de la molécula, desactivarla funcionalmente y conservar al mismo tiempo sus propiedades inmunógenas.

35 El tratamiento químico se puede efectuar con la ayuda de un agente de acoplamiento tal como un dialdehído, o de una proteína portadora activada por un pretratamiento con la ayuda de un dialdehído, preferentemente o el glutaraldehído. El tratamiento químico se puede llevar a cabo mediante la utilización de un monoaldehído, en particular de formaldehído. Para ello, se puede hacer referencia a las enseñanzas del documento WO-A-96/27389.

40 El tratamiento químico se puede llevar a cabo en particular mediante otros procedimientos tal como la carboximetilación o la carboxamidación. Un ejemplo de técnica de carboximetilación se ilustra en el documento WO-A-99/33872. El tratamiento químico se puede llevar a cabo asimismo por N-etilmaleidación asociada o no con una glutaraldehidación.

45 Se puede citar asimismo como técnica de desactivación la reacción de por lo menos una función tiol de la proteína con el 4-cloro-7-sulfobenzofurazano de amonio, la N-[yodoetil]-trifluoroacetamida o la N-(6-[7-amino-4-metilcoumarin-3-acetamido]hexil)-3'-(2'-piridilditio)propionamida así como la reacción de por lo menos una función amino de la proteína con el etilacetimidato, un anhídrido, el 2-iminotiolano clorhidrato, el N-succinimidil S-acetiltioacetato, el sulfosuccinimidil acetato, el sulfosuccinimidil-4-O-[4,4'-dimetoxitritil]butirato, el succinimidil 7-amino-4-metilcoumarin-3-acetato, el sulfosuccinimidil 7-amino-4-metilcoumarin-3-acetato o el fenilgloxal.

50 El inmunógeno puede ser desactivado gracias a una presentación galénica en el seno de un líquido oleoso, tal como el adyuvante incompleto de Freund o también susceptible de modificar los enlaces no covalentes (fuerzas electroestáticas, fuerzas de Van der Waals o enlaces hidrógeno) necesarios para sus efectos tóxicos.

55 Las modificaciones genéticas se pueden obtener por ingeniería genética que realiza inserciones, deleciones o sustituciones de residuos, operaciones destinadas a disminuir o suprimir los sitios funcionales deletéreos de la molécula natural. Los mutantes genéticos podrán o no sufrir un tratamiento químico y/o físico complementario. Las proteínas modificadas anteriormente pueden ser por ejemplo preparadas a partir de una proteína que tiene una secuencia idéntica o similar a una secuencia peptídica de una proteína inmunopatógena, en particular
60 inmunosupresora o angiogénica, tal como la proteína Tat del VIH-1, o de un fragmento de esta proteína, y ser obtenidas por ejemplo mediante síntesis peptídica convencional sobre resina o mediante ingeniería genética. Todos estos procedimientos son bien conocidos en el estado de la técnica. Los mutantes inactivos pero inmunógenos tienen por lo menos una molécula de ADN que codifica para su producción. Dichas moléculas de ADN presentan un interés particular en la presente invención, tal como se verá a continuación.

65 Con el fin de verificar que la proteína nativa inmunosupresora y/o angiogénica es bien reconocida por unos

anticuerpos dirigidos contra dicha proteína inmunosupresora modificada o su fragmento modificado o no según la invención, se puede por ejemplo verificar inmunológicamente por ELISA en presencia de anticuerpos específicos, la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

5 En unas condiciones preferidas de realización, el compuesto inmunógeno procede de un compuesto nativo (proteína o fragmento polipeptídico) tratado por un aldehído, o carboxamidado, o carboximetilado o maleimidado.

10 Con el fin de determinar si se han conservado suficientemente las propiedades inmunógenas de la proteína modificada inmunosupresora y/o angiogénica o de un fragmento de esta proteína (es decir si uno o la otra ha sido desactivado(a) pero no desnaturalizado(a) para crear unos anticuerpos que bloquean los efectos de dicha proteína nativa, se puede por ejemplo inmunizar unos mamíferos (conejos, ratas, ratones) con la ayuda de un compuesto inmunógeno según la invención y verificar que los anticuerpos producidos neutralizan las actividades inmunosupresoras o angiogénica de la proteína, como se verá para la proteína Tat del VIH-1, la proteína E7 del papilomavirus y la proteína Tax de HTLV1 en la parte experimental.

15 Con el fin de determinar si la proteína inmunosupresora modificada o el fragmento ha perdido por lo menos la proporción deseada de sus propiedades inmunosupresoras, se puede por ejemplo estudiar el efecto de la proteína inmunosupresora sobre la inmunosupresión de las células mononucleadas de la sangre periférica humana (PBMC).

20 El ADN (plásmido con promotor) puede ser liberado en las superficies mucosales en forma de ADN desnudo o formulado, por ejemplo en forma de liposomas catiónicos o concentrado alrededor de partículas de oro o también en forma de microesferas. Se utiliza ventajosamente en presencia de adyuvantes, en particular toxinas bacterianas tales como CT (toxina de la cholera) o de LT (enterotoxina lábil de *E. coli*). Dichas técnicas de inmunización mucosal con vacunas a base de moléculas de ADN se describen en particular en *Microbes and Infection*, 1999, 685-698 por McCluskie *et al.*

25 La proteína inmunosupresora o angiogénica modificada e inmunógena se puede derivar de una proteína en particular inmunosupresora de acción local inducida en el enfermo de SIDA; se considera particularmente la proteína Tat del virus VIH-1.

30 Por "se derivan" o "derivar" de una proteína inmunopatógena, en particular inmunosupresora o angiogénica de acción local producida por células cancerígenas o infectadas por un virus o producida por células inmunitarias, se entiende que el compuesto inmunógeno puede estar constituido por la totalidad o por un fragmento de la proteína inmunopatógena, en particular inmunosupresora o angiogénica de partida.

35 Puede comprender una o varias modificaciones en los aminoácidos de esta proteína o fragmento tales como unas deleciones, sustituciones, adiciones, o funcionalizaciones tales como acilación de aminoácidos, en la medida en la que estas modificaciones permanecen en el marco precisado anteriormente (ausencia de toxicidad, caracteres inmunológicos). Por ejemplo, en general, la sustitución de un residuo leucina por un residuo isoleucina no modifica dichas propiedades; las modificaciones se deben referir generalmente a menos del 40% de los aminoácidos, preferentemente menos del 20% y muy particularmente menos del 10% de la proteína inmunopatógena, en particular inmunosupresora o angiogénica. Es importante que la proteína o el fragmento modificado no sea desnaturalizada como se puede hacer, por ejemplo, mediante un tratamiento físico como el calor con el fin de preservar sus sitios conformacionales para que los anticuerpos inducidos por los derivados modificados sean activos frente a la proteína nativa.

40 En unas condiciones preferidas, los compuestos inmunógenos de la invención comprenden por lo menos el 50% de la totalidad o de un segmento de la proteína inmunopatógena, en particular inmunosupresora o angiogénica, preferentemente por lo menos 70%, particularmente por lo menos 90%, y muy particularmente la totalidad o casi la totalidad de dicha proteína inmunosupresora o angiogénica.

45 De manera general, en lo que se refiere a las modificaciones, la homología o la similitud entre el inmunógeno modificado y la proteína o parte de proteína inmunosupresora nativa, así como las dimensiones del compuesto inmunógeno, así como las modalidades de utilización, o de acoplamiento del compuesto inmunógeno según la invención a una proteína inmunógena tal como el toxoide tetánico, se puede hacer referencia en particular al documento WO-A-86/06 414 o al documento EP-A-0 220 273 o también al documento PCT/US 86/00831, equivalentes, cuya enseñanza está incorporada en la presente memoria a modo de referencia.

50 Se prefiere también un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente, que es un producto obtenido por recombinación genética que presenta una homología peptídica del 70% por lo menos con la proteína Tat del VIH-1 o con un segmento de esta proteína.

55 Se prefiere asimismo un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque está tratado por un aldehído, porque está carboxamidado, carboximetilado o maleimidado.

60 Se prefiere por último un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por un

acondicionamiento adyuvante que le hace biológicamente inactivo, tal como una emulsión oleosa en adyuvante de Freund incompleto (IFA).

Se puede también hacer derivar de un mutante homólogo el compuesto inmunógeno deseado.

Se recuerda en la presente memoria que por un acondicionamiento galénico de una proteína activa fisiológicamente, se puede enmascarar su actividad biológica conservando al mismo tiempo su inmunogenicidad.

La reacción de carboximetilación permite modificar los grupos tiol (grupos sulfhidrilo) presentes a nivel de los residuos cisteínas de la cadena de aminoácidos. La carboximetilación inactiva ciertas funciones tóxicas dependientes de los grupos SH como lo ha descrito para la proteína Tat Frankel *et al.* Cell Vol 55 (1988).

A parte de la carboximetilación, se pueden utilizar la carboxamidación o la maleimidación para bloquear los grupos SH y formar unos complejos S-carboximetilados, S-carboxamidados o S-maleimidados.

Por ejemplo, la proteína Tat posee 7 cisteínas. Estas cisteínas participan en la formación de puentes disulfuro inter e intra-cadenas y contribuyen a la formación de oligómeros.

El producto de la reacción es, en cada caso, un residuo S-carboximetilcisteinilo o S-carboximetilamidocisteinilo.

Un fragmento puede comprender de 8 a 110 aminoácidos por ejemplo, preferentemente de 12 a 60 aminoácidos y en particular de 12 a 40 aminoácidos. Un fragmento de este tipo puede comprender asimismo, por el o por los lados C o N terminal, de 1 a 5 aminoácidos suplementarios, es decir diferentes del segmento de origen. Un fragmento debe comprender además una cisteína por lo menos para poder ser objeto por ejemplo de una carboximetilación. Los fragmentos, si bien serán elegidos preferentemente inactivos por sí mismos, podrán ser sometidos en efecto si se desea a los mismos tratamientos de inactivación que las proteínas enteras o casi enteras.

La reacción de carboximetilación anterior también se puede realizar con otros agentes químicos como el ácido per fórmico, el ácido 3-bromopropiónico, la etilenimina, el bromuro de (2-bromoetil)trimetilamonio, el 2-bromoetanosulfonato, la 1,3-propanosulfona, etc.

En unas condiciones preferidas de realización del procedimiento descrito anteriormente, dicha proteína o dicho fragmento de partida se puede presentar en forma fusionada a un marcador (FP) o no fusionada (P). LA forma FP puede modificar *per se* la conformación molecular y por lo tanto modificar su actividad.

Las proteínas o fragmentos de partida del procedimiento son unos productos conocidos, cuyos procedimientos de desactivación pueden haber sido descritos en la bibliografía como en el documento WO-A-99/33872. Estas proteínas de partida pueden incluso estar comercializadas (Immunodiagnosics Inc. Cat# 1002-2) o pueden ser preparadas de manera convencional.

Se pueden preparar en particular las proteínas o fragmentos de partida anteriores mediante:

- 1) Síntesis por ingeniería genética o por síntesis bioquímica;
- 2) Purificación

Por ingeniería genética, se pueden purificar las proteínas producidas por cromatografía de afinidad utilizando por ejemplo unos anticuerpos dirigidos contra la proteína o uno de sus fragmentos; se puede sintetizar asimismo la proteína fusionada a un marcador (FP) que servirá para el enganche a una columna de afinidad.

En otras condiciones preferidas de realización del procedimiento descrito anteriormente, cuando la proteína o fragmento está fusionado a un marcador (FP), se somete a:

- una concentración, por ejemplo, por ultrafiltración;
- un desalado, por ejemplo, por gel de filtración;
- un tratamiento con bromuro de cianógeno o la enteroquinasa para escindir la proteína de fusión y liberar así la proteína o fragmento;
- una concentración y diafiltración;
- una cromatografía por intercambio catiónico;
- una concentración por ultrafiltración, seguida de una filtración sobre gel de exclusión.

La reacción con bromuro de cianógeno anterior permite escindir los tioéteres. La acción del bromuro de cianógeno

sobre las moléculas polipeptídicas es selectiva efectuando una escisión a nivel de los residuos metionina existentes. Esta reacción llega a la formación de 2 fragmentos polipeptídicos por residuo metionina. Esta reacción se puede acoplar ventajosamente en particular con la reacción de carboximetilación descrita anteriormente, pero no es necesaria para la desactivación.

5 En otras condiciones preferidas de realización del procedimiento descrito anteriormente, se prepara la proteína o el fragmento esperado(a) acoplado(a) a un compuesto que permite su purificación, por ejemplo a un fragmento peptídico que contiene varias histidinas, preferentemente en secuencia continua de 4, 5, en particular 6 histidinas o más que permiten la fijación a una columna de níquel. En la medida en la que la presencia de este compuesto no induce ninguna toxicidad y no modifica desfavorablemente la inmunogenicidad de la proteína o del fragmento, no es necesario escindirlos después de la purificación. Sin embargo, en condiciones de realización preferida, se escinde este compuesto para eliminarlo.

15 La presente solicitud tiene también por objeto la utilización

- de un producto obtenido a partir de la proteína Tat del VIH-1, que se modificará mediante cualquier técnica conocida como por vía química, física (de la cual la forma galénica) o por ingeniería genética, de tal manera que sus propiedades inmunosupresoras están inactivadas en por lo menos el 70%, preferentemente en por lo menos el 90%, en particular en por lo menos el 95%, por un tratamiento químico, físico y/o por construcción genética apropiada, incluso por una presentación apropiada, o
- de una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína inactivada por mutación o a dicho fragmento inactivo,

25 para la obtención de una composición farmacéutica para la vía mucosal, en particular para la vía mucosal como oral o para la vía intranasal destinada a conferir a un paciente una inmunidad mucosal, basada en la secreción de anticuerpos de clase IgA secretora.

30 La presente solicitud tiene también en particular por objeto la utilización de dichos productos para la fabricación de un tratamiento por la vía mucosa para luchar contra las proteínas inmunosupresoras y/o angiogénicas de acción local inducida en particular en el enfermo del SIDA.

35 Las proteínas modificadas que son unas proteínas inicialmente en particular inmunosupresoras y/o angiogénicas de acción local inducidas por los tumores cancerígenos en el enfermo de SIDA y cuyas propiedades inmunosupresoras son desactivadas por un tratamiento apropiado, los fragmentos y las moléculas de ADN que corresponden a estas proteínas nativas desactivadas por mutación o fragmentos, poseen propiedades farmacológicas muy interesantes. Tienen en particular remarcables propiedades antagonistas de las propiedades de las proteínas inmunosupresoras y/o angiogénicas de acción local inducidas por un tumor cancerígeno por producción de anticuerpos secretores de clase IgA.

40 Estas propiedades se ilustran a continuación en la parte experimental. Justifican la utilización de las proteínas modificadas descritas anteriormente, fragmentos y moléculas de ADN a título de medicamento.

45 En efecto, los compuestos según la invención han perdido sus propiedades inmunosupresoras o sus propiedades angiogénicas y pueden por lo tanto ser administrados al ser humano tal como se verá a continuación en la parte experimental.

50 Por ello, la presente solicitud tiene también por objeto una composición farmacéutica para la vía mucosa, en particular para la vía oromucosa como la vía intranasal u oral que contiene a título de principio activo un producto obtenido a partir de una proteína natural, la proteína Tat del VIH-1 según la invención, que se modificará mediante cualquier técnica conocida, como por vía química, física (de la cual la forma galénica) o por ingeniería genética, de tal manera que sus propiedades inmunosupresoras están inactivadas en por lo menos el 70%, preferentemente en por lo menos el 90%, en particular en por lo menos el 95%, por un tratamiento químico, físico y/o por construcción genética apropiada, incluso por una presentación apropiada, o una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína desactivada por mutación o a dicho fragmento inactivo.

60 Los medicamentos según la presente invención encuentran su uso por ejemplo tanto en el tratamiento curativo de cánceres, en particular de cánceres inducidos por virus como, por ejemplo, ATL (Acute T cell Leukemia) causado por el HTLV 1, o el cáncer del cuello uterino causado por el papilomavirus, o también el linfoma de Burkitt o el sarcoma de Kaposi causados por unos virus de la familia herpes, respectivamente el Epstein-Barr (EBV) y el HHV8, como en el tratamiento del SIDA.

65 Los compuestos inmunógenos según la invención se pueden utilizar de esta manera:

Se administra a un paciente, en forma adaptada para la administración mucosal, un compuesto inmunógeno o una

molécula de ADN según la presente invención, por ejemplo por vía intranasal, en cantidad suficiente para ser eficaz en el plano terapéutico, a un sujeto que necesita un tratamiento de este tipo. La dosis administrada puede estar comprendida, por ejemplo, entre 10 y 1000 µg por vía intranasal, una vez por semana durante dos meses, y después periódicamente en función de la tasa de los anticuerpos secretores inducidos, por ejemplo cada 2-6 meses.

Se podrán administrar en una misma preparación dos o varias moléculas inmunógenas y/o moléculas de ADN diferentes para inducir unos anticuerpos que neutralizan todos los sitios funcionales deletéreos en caso de que una sola molécula no contenga todos los sitios activos de la toxina o de la citoquina sobreproducida que se desea neutralizar.

La invención tiene asimismo por objeto las composiciones farmacéuticas destinadas a las mucosas que contienen por lo menos un compuesto inmunógeno o una molécula de ADN citada anteriormente, a título de principio activo.

A título de medicamentos, los compuestos inmunógenos o las moléculas de ADN de la invención pueden ser incorporados en unas composiciones farmacéuticas destinadas a la vía mucosa, en particular oromucosa, en particular la vía intranasal o la vía oral. La administración puede tener lugar en dosis única o repetida, una o varias veces después de un cierto intervalo de tiempo.

Por ello, la presente solicitud tiene asimismo por objeto una composición farmacéutica, curativa o preventiva para la vía mucosa, caracterizada porque comprende, a título de principio activo, uno o varios compuestos inmunógenos tales como se han descrito anteriormente, o sus fragmentos o moléculas de ADN que corresponden a la proteína nativa a combatir. El compuesto inmunógeno, fragmento o molécula de ADN pueden ser acondicionados solo o mezclado con un excipiente o con una mezcla de excipientes farmacéuticamente aceptables tal como un adyuvante. Entre los excipientes destinados a la vía intranasal u oral, se consideran particularmente los capril caproil macrogol glicéridos como el Labrasol[®] de la compañía GATTEFOSSE o el hidróxido de alúmina (Alhydragel, Superfos, Dinamarca).

Se debe observar que, administrado tal cual, según una formulación oral convencional, el principio activo según la invención sería inactivo.

Para la administración oral según la invención, se asociará el principio activo a un adyuvante de inmunidad mucosal tal como un mutante de CT o de LT.

Se consideran en particular las formas galénicas descritas por Boyaka *et al.*: «Strategies for mucosal vaccine development» en Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(4), 1999, páginas 35-45. Se pueden citar asimismo los microgránulos gastroresistentes, en particular bioadhesivos tales como los descritos por Rojas *et al.* en Pharmaceutical Research, Vol. 16, n^o 2, 1999, página 255.

La presente solicitud tiene más particularmente por objeto una vacuna mucosal que contiene, a título de inmunógeno, un compuesto inmunógeno definido anteriormente y en particular una proteína inicialmente inmunosupresora y/o angiogénica de acción local inducida por un tumor cancerígeno o por células infectadas por un virus tal como el VIH o un fragmento de esta proteína cuyas propiedades inmunosupresoras y/o angiogénicas son desactivadas en por lo menos el 70% por un tratamiento apropiado o una molécula de ADN que corresponde a esta proteína desactivada por mutación o a dicho fragmento inactivo.

En unas condiciones preferidas de realización, se considera una composición farmacéutica vacunal anterior, caracterizada porque comprende un adyuvante de inmunidad mucosal, tal como un mutante de CT (toxina del cólera) o de LT (enterotoxina lábil de *E. coli.*).

En otras condiciones preferidas de realización, se considera una composición farmacéutica vacunal anterior, caracterizada porque contiene un adyuvante que adsorbe el principio activo, tales como el hidróxido de alúmina o las partículas de oro.

En todavía otras condiciones preferidas de realización, se considera una composición farmacéutica anterior, caracterizada porque la proteína se obtiene mediante recombinación genética y presenta una homología peptídica del 70% por lo menos con la proteína Tat del VIH-1, o con un segmento de esta proteína.

En todavía otras condiciones preferidas de realización, se considera una composición farmacéutica anterior, caracterizada porque la proteína ha sido tratada mediante un aldehído y ha sido carboximetilada, carboxamidada o maleimidada.

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de preparación de una composición descrita anteriormente, caracterizado porque se mezclan, según unos métodos conocidos en sí, el o los principios activos con unos excipientes aceptables, en particular farmacéuticamente aceptables y, llegado el caso, con un adyuvante de inmunidad mucosal.

En unas condiciones preferidas de realización del procedimiento anterior, se preparan unos microgránulos bioadhesivos y gastrorresistentes para la vía oral digestiva que contiene los principios activos inmunógenos y, llegado el caso, los adyuvantes.

5 La administración a un paciente de compuestos inmunógenos según la invención por vía mucosal corresponde a una inmunoterapia activa. Puede ser interesante también proceder a una inmunoterapia pasiva, es decir proporcionar a un paciente directamente unos anticuerpos de clase IgA que necesita para neutralizar los efectos nocivos de las proteínas anteriores, por ejemplo unas proteínas inmunosupresoras de acción local inducidas por tumores.

10 Estos anticuerpos de clase IgA, por ejemplo anti-proteínas inmunosupresoras y/o angiogénicas, se pueden obtener de manera habitual.

15 Por ello, la presente solicitud tiene también por objeto dichos procedimientos de preparación de anticuerpos de clase IgA anti-proteínas, en particular inmunosupresoras y/o angiogénicas de un tumor cancerígeno y en particular de anticuerpos anti-proteína E7 del papilomavirus o anti-proteína Tax de HTLV1, y en particular un procedimiento de preparación de un anticuerpo de clase IgA anterior, caracterizado porque se inmuniza un mamífero con la ayuda de un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente, y después se recuperan los anticuerpos formados.

20 La presente solicitud tiene también por objeto un anticuerpo de clase IgA anti-proteína inmunosupresora o angiogénica segregada por las células de un tumor cancerígeno, o infectadas por un virus tal como el VIH-1 y en particular unos anticuerpos policlonales o monoclonales obtenidos a partir de mamíferos inmunizados con un compuesto inmunógeno definido anteriormente y en particular una proteína inmunosupresora o angiogénica de un tumor cancerígeno biológicamente desactivado pero inmunógeno, en particular la proteína E7 del papilomavirus o la proteína Tax de HTLV1, o sus fragmentos. Estos anticuerpos administrados pasivamente, ya sean alogénicos (humanos) o xenogénicos (animales), podrán ser unos anticuerpos monoclonales o policlonales completos o fragmentos F(ab')₂ o Fab del anticuerpo.

30 Por "anticuerpo anti-proteína inmunosupresora o angiogénica de un tumor cancerígeno", se entienden unos anticuerpos monoclonales o policlonales o unos fragmentos F(ab')₂ o Fab de estos anticuerpos, o también unos anticuerpos anti-proteína inmunosupresora o angiogénica producidos por las células de un tumor cancerígeno o infectadas por el VIH-1, obtenidos por construcción genética a partir de una librería de fagos.

35 Los anticuerpos xenogénicos proceden de animales hiperinmunizados con un compuesto inmunógeno según la invención, en particular con la proteína E7 del papilomavirus o la proteína Tax de HTLV1 o sus derivados (fragmentos peptídicos de la proteína E7 del papilomavirus o de la proteína Tax de HTLV1 detoxificados según la invención), y son

- 40
- o bien policlonales que proceden de animales hiperinmunizados,
 - o bien monoclonales, obtenidos después de la hibridación según la técnica de Kohler y Milstein de células esplénicas o de adenocitos con una línea mielomatosa, tipo x63, en particular x63AG3. En este caso, se prefieren los anticuerpos equinos o de conejo.
- 45

La presente solicitud tiene asimismo por objeto un procedimiento de preparación de anticuerpos de clase IgA anti-proteína inmunosupresora o angiogénica de un tumor cancerígeno, caracterizado porque se inmuniza por vía mucosa un mamífero, humano o animal, con un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente.

50 La presente solicitud tiene asimismo por objeto un procedimiento de obtención de anticuerpos de clase IgA anti-proteína inmunosupresora o angiogénica, mediante la tecnología de recombinación genética, caracterizado porque se utiliza a título de inmunógeno un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente.

55 La presente solicitud tiene también por objeto unos fragmentos F(ab')₂ o Fab de dichos anticuerpos de clase IgA; éstos pueden ser obtenidos por digestión enzimática por ejemplo.

60 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de inmunización pasiva de sujetos cancerígenos o enfermos del SIDA, que utiliza unos anticuerpos específicos de clase IgA anti-proteína inmunosupresora o angiogénica de un tumor cancerígeno o producido por células infectadas por un virus y especialmente anti-proteína E7 del papilomavirus o anti-proteína Tax de HTLV1 que neutraliza o bloquea los efectos nocivos de esta proteína y que se pueden preparar como se ha indicado anteriormente, o unos fragmentos F(ab')₂ o F(ab) de estos anticuerpos.

65 La presente solicitud tiene asimismo por objeto un procedimiento de inmunización activa, caracterizada porque se utiliza a título de inmunógeno un compuesto inmunógeno tal como se ha definido anteriormente, ventajosamente asociado a un adyuvante de inmunidad mineral, oleoso o de síntesis, o también un compuesto inmunógeno tal como

se ha definido anteriormente, ventajosamente acoplado, por ejemplo, con la ayuda de un dialdehído o asociado a una proteína que aumenta su inmunogenicidad o también una molécula de ADN que corresponde a la proteína a combatir pero desactivada por mutación.

5 Estas inmunizaciones pueden ser realizadas tanto a título curativo como a título preventivo.

A título de inmunógenos, para todos los procedimientos anteriores y siguientes, se utiliza preferentemente un derivado de la proteína E7 del papilomavirus o de la proteína Tax de HTLV1.

10 La invención tiene además por objeto una composición farmacéutica para la vía mucosal que comprende, a título de principio activo curativo o preventivo, por lo menos un anticuerpo de clase IgA anti-proteína inmunosupresora o angiogénica de un tumor cancerígeno tal como se ha definido anteriormente u obtenido según los procedimientos anteriores eventualmente asociado a un anticuerpo de clase IgG anti-proteína inmunosupresora o angiogénica de un tumor cancerígeno.

15 En resumen y particularmente, la presente invención tiene por objeto el uso a título preventivo, o curativo en el sujeto con cáncer o que padece SIDA, de anticuerpos de clase IgA de manera que bloqueen la acción, en particular inmunosupresora, de una proteína de acción inmunosupresora local o angiogénica de un tumor cancerígeno o de las células infectadas por un virus, y en particular de la proteína Tat del VIH-1. Estos anticuerpos específicos de clase IgA podrán proceder:

20 1. del propio sujeto, inducidos por una inmunización activa (vacunación) con una proteína inmunosupresora local de un tumor cancerígeno segregada por las células infectadas por un virus, privada de dichos efectos inmunosupresores pero inmunógena (se han preservado las propiedades susceptibles de inducir la formación de anticuerpos cuando la proteína se presenta y se prepara de manera apropiada, acoplada o no a un "carrier", agregada o no, en presencia o no de adyuvante) o con una molécula de ADN que corresponde a la proteína a combatir pero desactivada por mutación, o a dicho fragmento inactivo, o

25 2. de un organismo exterior, alo- o xenogénico, administrado al sujeto por inmunización pasiva (seroterapia). Estos anticuerpos de clase IgA administrados pasivamente, podrán ser unos anticuerpos monoclonales o policlonales completos o unos fragmentos F(ab')₂ o Fab del anticuerpo.

30 La invención tiene asimismo por objeto unas composiciones farmacéuticas, y en particular una composición farmacéutica que comprende, a título de agente preventivo o curativo, unos anticuerpos de clase IgA anti-proteína de acción inmunosupresora o angiogénica local de un tumor cancerígeno producidos a partir de organismos inmunizados contra dicha proteína o sus fragmentos F(ab')₂ o Fab, según la invención.

35 Además, la invención propone asimismo un kit que comprende una composición farmacéutica vacunal que, además del principio activo (proteína inicialmente inmunosupresora o angiogénica local de un tumor cancerígeno pero privada de dichos efectos inmunosupresores o angiogénicos e inmunógena o sus derivados o anticuerpos de clase IgA anti-proteína inmunosupresora o angiogénica local de un tumor cancerígeno o molécula de ADN) puede comprender un adyuvante y/o otro inmunógeno con propiedades anticancerígenas.

40 Por último, la invención propone una composición farmacéutica adaptada para la administración mucosal.

45 Para disminuir la carga inmunosupresora producida por el tumor y mejorar aún más la respuesta inmunitaria, se podrá asociar a esta inmunización anti-supresora una inmunización por vía general, por ejemplo obtenida por inyección subcutánea, incluso unos medios más clásicos que tienen como objetivo disminuir el tamaño del tumor como la quimioterapia, la radioterapia, la exéresis quirúrgica o también la adición de genes supresores de los tumores aportados por unas técnicas de la terapia génica (ADN vehiculados por unos vectores virales, vectores lipídicos, etc.) o también como la inmunización activa contra proteínas sin acción inmunosupresora o angiogénica local como las MAGE o unas proteínas de estructura como las del papilomavirus.

50 Se podrá asimismo asociar otras inmunizaciones antisupresoras y/o angiogénicas, por ejemplo inmunizando contra unas citoquinas o unas lectinas susceptibles de servir como mediador en la acción supresora sobre las células inmunitarias o asociar unas inmunizaciones contra unos antígenos tumorales clásicos (no inmunosupresores o angiogénicos) susceptibles de aumentar la respuesta inmunitaria celular particularmente asesina (células CTL o células NK) dirigida contra las células tumorales o infectadas por virus. La ventaja de estas asociaciones es que permitirán que el sistema inmunitario responda mejor a la inmunización anti-inmunosupresora y por lo tanto se reconstituya mejor.

55 Para resumir, a la inmunización mucosal contra un factor inmunosupresor o angiogénico paracrino presentada en forma inactiva pero todavía inmunógena, se podrán asociar unos métodos más clásicos como la radioterapia, la quimioterapia, la exéresis quirúrgica o el tratamiento por genes supresores o también inmunizaciones contra unas citoquinas o unas lectinas producidas por células inmunitarias (células T o APC) que median la acción inmunosupresora y/o angiogénica o contra unos antígenos tumorales.

En efecto, en ciertos cánceres, incluso de origen viral, unos factores solubles de origen celular, tales como las citoquinas o las lectinas también pueden desempeñar localmente un papel de mediador de la inmunosupresión y/o de la angiogénesis en el seno de los tumores. Es el caso de la IFN α , citoquina inmunosupresora, sobreproducida localmente en el seno de los tejidos linfoides infectados por el VIH en la enfermedad del SIDA.

El experimento *in vitro* sobre células mononucleadas de la sangre (PBMC) infectadas por el VIH-1 ha mostrado que la proteína Tat estaba implicada en la sobreproducción por los APC de la citoquina IFN α inmunosupresora. De manera interesante, la proteína E7 del HPV, al igual que la proteína Tat del VIH-1, induce la sobreproducción de IFN α inmunosupresora por los APC.

En consecuencia, se podrá combatir asimismo el escape inmunitario y/o la angiogénesis de los cánceres, induciendo o administrando unos anticuerpos dirigidos específicamente contra las citoquinas cuyas sobreproducción es responsable de inmunopatogénesis, en particular de inmunosupresión, tal como IFN α y/o de la angiogénesis, tal como el TNF α de acuerdo con la solicitud de patente internacional WO 92/225.

Así, los efectos inmunosupresores debidos a la sobreproducción de IFN α en los cánceres de la enfermedad del SIDA y del cuello uterino, al igual que los debidos a la sobreproducción de TGFB en los gliomas viro-inducidos podrán ser bloqueados por unos anticuerpos dirigidos contra estas citoquinas naturales inducidas por una inmunización activa (vacunación) utilizando unos citoquinoides (citoquinas modificadas biológicamente inactivas pero inmunógenas) como vacuna. Dichos anticuerpos podrán asimismo ser administrados pasivamente (inmunización pasiva).

Los ejemplos y experimentos a continuación ilustran la presente solicitud.

Ejemplo 1. Preparación de Tat carboxamidado

El Tat carboxamidado es un producto inactivo pero inmunógeno que se ha preparado mediante carboxamidación de la proteína Tat recombinante nativa. Se ha descrito en particular una preparación de la proteína Tat en el documento WO-A-99/33872.

El Tat toxoide se ha preparado de la siguiente manera:

La proteína Tat nativa recombinante (en la solución más concentrada posible) se dializa durante 16 horas contra tampón Tris, HCl 0,3 M, que contiene guanidina 6M y ditiotreitól 10 mM (relación volumen de solución de Tat/ volumen de tampón de diálisis: 1/20).

Después de la diálisis, se recoge la solución de Tat y se mide su volumen. La solución se desairea por percusión bajo presión reducida. Se añade entonces una solución de ácido yodoacetamida 0,5 M desaireada por circulación de una corriente de nitrógeno (en una proporción de 28 μ l de ácido yodoacetamida 0,5 M por ml de solución Tat).

Bajo atmósfera de nitrógeno, la reacción se cumple durante 90 minutos, a 37°C, protegida de la luz.

La reacción se bloquea entonces mediante adición de β -mercaptoetanol concentrado (0,65 μ l por ml de mezcla de reacción).

La mezcla se coloca de nuevo durante 60 minutos, a 37°C, protegida de la luz, bajo atmósfera de nitrógeno.

La mezcla se dializa después, bajo agitación, contra un tampón Tris, HCl 0,3 M que contiene:

- Urea 8M: 2 horas a temperatura ambiente
- Urea 4M: 2 horas a temperatura ambiente
- Urea 2M: 2 horas a temperatura ambiente
- PBS 1X: 16 horas a 4°C.

La reacción de carboxiamidación permite modificar los grupos tioles (grupos sulfhidrilo) presentes a nivel de los residuos cisteínas de la cadena en aminoácidos. Estos grupos reaccionan con el ácido yodoacetamida por una reacción de S-carboxiamidometilación. El producto de la reacción es un residuo S-carboximetilamidocisteinilo.

Ejemplo 2. Preparación vacunal recombinante (cepa Lister) que expresa la gp160 del VIH-1 (cepa (LAV/IIIB): constructo donado por Beaud (Institut Jacques Monod, CNRS, Paris, Francia).

Ejemplo 3. Plásmido de expresión pSV-Tat

El plásmido de expresión pSV-Tat se amplificó en *E. coli* y se purificó por centrifugación en cloruro de cesio (Advanced Biotechnologies Inc.).

Los compuestos inmunógenos de los ejemplos 1, 2 y 3 se asociaron a un adyuvante con el fin de potencializar la respuesta inmunitaria.

5 Los adyuvantes

Se han ensayado diferentes tipos de adyuvantes:

- 10 - la toxina termolábil mutada (L.T. mutada) de *Escherichia coli* enterotoxígena (ETEC): la LT (R192G) descrita por Cardenas-Freytag L *et al*, Effectiveness of a vaccine composed of heat-killed *Candida albicans* and a novel mucosal adjuvant, LT (R192G), against systemic candidiasis, *Infect immun*; 1999, 67:826-33,
- la subunidad B (CTB) de la toxina colérica (CT) de la bacteria *Vibro cholerae* contaminada por la CT total,
- 15 - el Montanide IMS 1113,
- el C92512,
- 20 - el ISA 51. (SEPPIC).

Ejemplo 4

Se ha preparado una solución intranasal que responde a la fórmula

- 25 Compuesto del ejemplo 2 10 mg
- Excipiente c.s. para una solución intranasal terminada a 20 ml

(detalle del excipiente: Labrasol[®], cloruro de sodio, benzoato de sodio, agua para preparaciones inyectables).

30 **Ejemplo 5**

Se ha preparado una solución intranasal que responde a la fórmula

- 35 Tat carboximetilado descrito en el documento WO-A-99/33872 10 mg
- Excipiente c.s. para una solución intranasal terminada a 20 ml

(detalle del excipiente: Labrasol[®], cloruro de sodio, benzoato de sodio, agua para preparaciones inyectables).

40 **Ejemplo 6**

Se han preparado unas cápsulas orales que contienen cada una:

- 45 Compuesto del ejemplo 1 200 µg
- Alhydrogel de Superfos 20 µg
- Excipiente *pero os* c.s.p. 0,5 ml

Estudio farmacológico

50 *Experimento 1*

Protocolo: unos ratones han recibido por vía intramuscular 100 µl de emulsión (1:1), en ISA 51 que contiene 25 µg de Tat carboxamidado del ejemplo 1 y 5 µg de LT el día 0. Después, los días 7, 14 y 21, estos ratones han recibido por vía intranasal 10 a 15 µl de una preparación que contiene 25 µg de Tat carboxamidado del ejemplo 1 y 3 µg de LT. El suero de estos ratones se recogió el día 28.

55 La búsqueda de anticuerpos anti-Tat, de tipo IgG e IgA en su suero se ha realizado mediante el ensayo ELISA siguiente: se sensibilizan unas placas con Tat carboxamidado (1 µg/pocillo). Se ensayan los sueros, diluidos al 1/4 para detectar los anticuerpos de tipo IgA o diluidos al 1/50 para los anticuerpos de tipo IgG, según los protocolos estándar de ELISA. Los resultados obtenidos están expresados en D.O.

60

	Clase	Ratones control	Ratones inmunizados
Ac. Anti-Tat	IgG	0,175	2,224
Ac. Anti-Tat	IgA	0,461	1,759

Este protocolo de inmunización ha conducido a aumentar la tasa de los anticuerpos específicos de clase IgG e IgA, asegurando una inmunidad al mismo tiempo sistémica y mucosal, confirmada por la presencia de IgA secretoras en

los lavados de las secreciones intestinales realizadas según la técnica de Elson C.V. *et al.* (J. of Immunol Methods, 1984, 67: 101-108).

Experimento 2:

Protocolo: unos ratones han recibido por vía intranasal 10 a 15 µl de emulsión (1:1), en IMS 1113 o C92512, que contiene 25 µg de Tat carboxamidado y 5 µg de LT el día 0. Después, los días 7 y 14, estos ratones han recibido por vía intranasal 10 a 15 µl de emulsión (1:1), respectivamente en IMS 1113 o en C92512, que contiene 25 µg de Tat toxoide y 3 µg de LT. El suero de estos ratones se recogió el día 21. La búsqueda de anticuerpos anti-Tat, de tipo IgG e IgA en su suero se ha realizado mediante el ensayo ELISA descrito en el experimento 1.

	Clase	Ratones control	Ratones inmunizados (C92512)	Ratones inmunizados (IMS 1113)
Ac. Anti-Tat	IgG	0,2	2,220	1,543
Ac. Anti-Tat	IgA	0,7	0,7	1,092

La utilización de adyuvante IMS 1113 (Seppic, Francia) ha permitido inducir una inmunidad mucosal, caracterizada por la amplificación de la tasa de anticuerpos anti-Tat de clase IgA. Por el contrario, la adición de adyuvante C92512 (Seppic, Francia) no lo ha permitido.

Experimento 3:

Protocolo: unos ratones han recibido por vía intranasal 10 a 15 µl de una preparación que contiene 10 µg del plásmido del ejemplo 3, 5 µg/ml de CTB y 5 µg/ml de CT el día 0, los días 7 y 14, estos ratones han recibido por vía intranasal 10 a 15 µl de una preparación que contiene 25 µg de Tat toxoide y 5 µg/ml de CTB y 0,5 µg/ml de CT. El suero de estos ratones se recogió el día 21. La búsqueda de anticuerpos anti-Tat, de tipo IgG e IgA en su suero se ha realizado mediante el ensayo ELISA descrito en el protocolo del experimento 1.

	Clase	Ratones control	Ratones inmunizados
Ac. Anti-Tat	IgG	0,3	2,123
Ac. Anti-Tat	IgA	0,2	1,951

La inmunización por vía intranasal mediante plásmido anti-Tat caracterizada por un aumento de IgA se confirma por la presencia de IgA secretoras en las secreciones intestinales.

Experimento 4:

Protocolo: unos ratones han recibido por vía oral 200 µl de una preparación que contiene 10⁶ PPU/ml de vacuna recombinante que expresa la gp160, 5 µg/ml de CTB y 0,5 µg/ml de CT los días 0, 7 y 14. El suero de estos ratones se recogió el día 21.

La búsqueda de anticuerpos anti-Tat, de tipo IgG e IgA en su suero se ha realizado mediante el ensayo ELISA siguiente: se sensibilizan unas placas con gp160 recombinante nativa (1 µg/pocillo). Se ensayan los sueros, diluidos al 1/4 para detectar los anticuerpos de tipo IgA o diluidos al 1/50 para los anticuerpos de tipo IgG, según los protocolos estándar de ELISA. Los resultados obtenidos están expresados en D.O.

	Clase	Ratones control	Ratones inmunizados
Ac. Anti-gp160	IgG	0,112	1,283
Ac. Anti-gp160	IgA	0,440	1,02

El aumento de los anticuerpos de clase IgG e IgA refleja una inmunidad al mismo tiempo sistémica y mucosal anti-gp160.

Experimento 5:

Protocolo: unos ratones han recibido por vía intranasal los días 0, 7, 14 y 21, 10-15 µl de PBS que contiene como inmunógeno 50 µg de Tat carboxamidado del ejemplo 1 y como adyuvante LT (3-5 µg) y 2 µl de hidróxido de aluminio (Alhydrogel 85 de Superfos Biovector, Dinamarca). La búsqueda de anticuerpos anti-Tat de tipo IgG e IgA en sus sueros se realizó por ELISA según el protocolo del ejemplo 1.

	Clase	Ratones control	Ratones inmunizados
Ac. Anti-Tat	IgG	0,182	2,042
Ac. Anti-Tat	IgA	0,461	1,258

La agregación del inmunógeno Tat toxoide alrededor de las partículas de hidróxido de alúmina en presencia de LT ha facilitado la respuesta anticuerpos anti-Tat.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización, en combinación con un adyuvante de inmunidad mucosal, de la proteína Tat del virus VIH1 cuyas propiedades inmunosupresora y/o angiogénica se han desactivado en por lo menos el 70%, por un tratamiento físico y/o químico, por recombinación genética o también por un acondicionamiento adyuvante, conservándole dicho tratamiento la propiedad de ser reconocida por unos anticuerpos dirigidos contra dicha proteína Tat, y conservándole unas propiedades inmunógenas suficientes para generar unos anticuerpos que neutralizan o bloquean dicha proteína Tat nativa, o también la utilización de una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína Tat desactivada por mutación o de una molécula de ADN que corresponde a dicho fragmento inactivo, para la obtención de un medicamento que confiere una inmunidad mucosal basada en la secreción de anticuerpos de clase IgA, para el tratamiento de cánceres relacionados con las infecciones por el virus VIH-1.
- 15 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho medicamento consiste en una composición farmacéutica vacunal para la vía mucosal.
3. Utilización según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque dicho medicamento está adaptado para la administración por vía oral o por vía intranasal.
- 20 4. Utilización según una de las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizada porque el compuesto inmunógeno ha sido tratado por un aldehído, o carboxamidado, o carboximetilado o maleimidado, u oxidado por barboteo de oxígeno.
5. Utilización según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizada porque la proteína Tat utilizada es una proteína Tat mutada.
- 25 6. Utilización según una de las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizada porque se utiliza una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína Tat desactivada por mutación, o una molécula de ADN que corresponde a dicho fragmento inactivo.
- 30 7. Composición farmacéutica vacunal para la vía mucosa, que contiene a título de principio activo la proteína Tat del virus VIH1 cuyas propiedades angiogénicas y/o inmunosupresoras se han desactivado en por lo menos el 70%, por un tratamiento físico y/o químico, por recombinación genética o también por un acondicionamiento adyuvante, conservándole dicho tratamiento la propiedad de ser reconocida por unos anticuerpos dirigidos contra dicha proteína, y conservándole unas propiedades inmunógenas suficientes para generar unos anticuerpos que neutralizan o bloquean dicha proteína nativa, o también una molécula de ADN que corresponde a dicha proteína Tat desactivada por mutación, o una molécula de ADN que corresponde a dicho fragmento inactivo, en combinación con un adyuvante de inmunidad mucosal.
- 35 8. Composición farmacéutica vacunal según la reivindicación 7, caracterizada porque consiste en una composición para la vía oral digestiva o para la vía nasal.
- 40 9. Composición según una de las reivindicaciones 7 y 8, caracterizada porque el adyuvante de inmunidad mucosal se selecciona de entre un mutante de CT (toxina del cólera) y un mutante de LT (enterotoxina lábil de *E. coli*).
- 45 10. Composición farmacéutica vacunal según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque contiene un adyuvante que adsorbe el principio activo.
- 50 11. Composición farmacéutica vacunal según la reivindicación 10, caracterizada porque el adyuvante que adsorbe el principio activo se selecciona de entre el hidróxido de alúmina y las partículas de oro.
- 55 12. Composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 7 a 11, caracterizada porque la proteína se obtiene por recombinación genética y presenta una homología peptídica del 70% por lo menos con la proteína Tat del VIH1 o con un segmento de la proteína Tat del VIH1.
- 60 13. Composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizada porque la proteína ha sido tratada por un aldehído o ha sido carboximetilada, carboxamidada o maleimidada, u oxidada por barboteo de oxígeno.
- 65 14. Procedimiento de preparación de una composición farmacéutica, caracterizado porque se prepara una composición para la vía mucosa, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 7 a 13, por mezcla del o de los principios activos inmunógenos con un adyuvante de la inmunidad mucosal.
15. Anticuerpo purificado de clase IgA anti-proteína Tat del virus VIH1.
16. Fragmento F(ab')₂ o F(ab) de un anticuerpo tal como se ha definido en la reivindicación 15.
17. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de clase IgA anti-proteína Tat según una de las

reivindicaciones 15 o 16.

18. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de clase IgG anti-proteína Tat del virus VIH1 y un anticuerpo de clase IgA anti-proteína Tat del virus VIH1.

5