

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 872**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2001 E 01963076 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 1309343**

54 Título: **Vacuna contra la IL-10 procedente de tumores malignos**

30 Prioridad:

09.08.2000 FR 0010480

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

27.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZAGURY, JEAN-FRANÇOIS;
BIZZINI, BERNARD;
LE BUANEC, HÉLÈNE y
ZAGURY, DANIEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 439 872 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 la IL-10 procedente de tumores malignos.

- 5 La presente invención se refiere a la utilización de preparaciones vacunales medicamentosas de uso terapéutico o profiláctico destinadas a tratar o a prevenir en los tumores malignos los trastornos inmunitarios, en particular la inmunosupresión y la apoptosis de las células inmunitarias o vasculares como la angiogénesis, inducidas por factores extracelulares, citoquinas u otros factores de regulación, en particular transcripcionales, anormalmente producidos por las células cancerosas o las células estromales.
- 10 Los tratamientos convencionales de los cánceres, ya sean de origen viral, inducidos por unos retrovirus, o el EBV o el HPV o también los virus de la hepatitis, o de origen crónico, que se deben al amianto o a derivados benéficos, ya sean de tipo epitelial (carcinomas) o conjuntivo (sarcomas) o también sanguíneo (linfomas) comprenden la ablación quirúrgica de los tumores generalmente asociada a una quimioterapia y/o una radioterapia.
- 15 Aunque eficaces para algunos cánceres, particularmente tomados en etapas tempranas, estos tratamientos a menudo difícilmente tolerados son insuficientes y las recidivas y las metástasis comprometen la evolución de los enfermos.
- 20 Por ello, cuando los científicos en los años 80 y 90 han clonado y purificado unos antígenos de tumores asociados (TAA) o específicos (TSA) a las células cancerosas que proceden de numerosos tumores malignos (cáncer de mama, de la próstata, colorrectal, del cuello uterino; linfoma ATL), se han realizado numerosos experimentos y ensayos clínicos de vacunación anti-cáncer (Dvorak E. Experimental design for vaccine preparations against human malignant tumors. *Med Hypotheses* (1986) 20:429-52, Houghton AN. On course for a cancer vaccine. *Lancet* (1995) 345:1384-5, Herlyn D, Linnenbach A, Koprowski H, Herlyn M. Epitope-and antigen-specific cancer vaccines. *Int Rev Immunol* (1991) 7:245-57, Ostankovitch M, Chopin J, Guillet JG. Tumor cell antigenicity: cancers and vaccines. *Rev Prat* (1995) 45:1921-6, Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY. Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* (2000) 6:24-33, Tsunoda T, Tanimura H, Yamaue H, Tanaka H, Matsuda K. Tumor specific CTL therapy for advanced cancer and development for cancer vaccine. *Hepatology* (1999) 46:1287-92), que utilizan como antígenos los TAA y TSA, que pretende destruir específicamente las células malignas portadoras de estos antígenos gracias a la acción de las células asesinas, particularmente de linfocitos citotóxicos (CTL), portadores de receptores específicos, inducidos por la reacción inmunitaria vacunal.
- 25 30 35 Los ensayos clínicos que utilizan dichas vacunas realizados en los enfermos portadores de diferentes tumores (melanoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de la vejiga, etc.) han permitido establecer los hechos siguientes:
- 40 - Las preparaciones vacunales anti-cáncer que contienen los antígenos tumorales (TAA o TSA) presentados en diferentes formas han sido bien toleradas y no han provocado generalmente complicaciones regionales o sistémicas.
 - 45 - Dichas preparaciones vacunales pueden inducir en los enfermos una respuesta inmunitaria de tipo CTL (Tsunoda T, Tanimura H, Yamaue H, Tanaka H, Matsuda K. Tumor specific CTL therapy for advanced cancer and development for cancer vaccine. *Hepatology* (1999) 1:1287-92, Schwaab T, Heaney JA, Schned AR, Harris RD, Cole BF, Noelle RJ, Phillips DM, Stempkowski L, Ernstoff MS. A randomized phase II trial comparing two different sequence combinations of autologous vaccine and human recombinant interferon gamma and human recombinant interferon alpha2B therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: clinical outcome and analysis of immunological parameters. *J Urol* (2000) 163:1322-7, Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marincola FM. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* (1998) 4:2103-9, susceptible, *in vitro*, de destruir específicamente las dianas celulares portadoras de epítopos de TAA o TSA complejados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
 - 55 - Por el contrario, en la actualidad, ningún ensayo clínico de fase III ha podido demostrar que estas preparaciones vacunales, que pretenden destruir específicamente las células cancerosas por la diferenciación de células asesinas, eran eficaces.
- 60 Así, a partir de 1992, después de que Levine (*The p53 tumor suppressor gene and gene product. Princess Takamatsu Symp* (1989) 20:221-30) así como otros equipos de científicos hayan demostrado que la proteína p53 natural, que tiene unos efectos de reparación sobre las hebras de ADN y unos efectos inmunosupresor del ciclo celular o un mutante de esta proteína se producía abundantemente y se acumulaba en los tumores malignos, el mismo Levine propone realizar una vacunación que utiliza la proteína p53, que aparece como un antígeno de tumor asociado (TAA). Ésta estaba presentada en la superficie de células dendríticas (DC) o adyuvantada en un vector bacteriano (tipo BCG) con el fin de inducir una respuesta inmunitaria de tipo CTL dirigida contra las células
- 65

cancerosas (véase también el documento WO-A-94/02167).

En apoyo a esta solicitud de patente, unas publicaciones científicas muestran el papel beneficioso de las células asesinas y el papel peyorativo de los anticuerpos específicos en la evolución de los tumores malignos (Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen. Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92:11993-7, Roth J. *et al.*, p53 as a target for cancer vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect mice against lethal tumor cell challenge, 1996, Proc Natl Acad Sci USA.; 93:4781-6).

Después de Levine, otros equipos, modificando el vector o el adyuvante del inmunógeno p53, han depositado una decena de solicitudes de patentes sobre la utilización de nuevas presentaciones galénicas de vacuna anti-p53 que pretenden también inducir la formación de células asesinas CTL dirigiendo las células cancerosas que expresan la proteína p53.

Los ensayos experimentales asociados a estas vacunas anti-p53 han mostrado la inocuidad y la inmunogenicidad evaluada por la aparición de células asesinas anti-p53. Además, el único ensayo clínico de vacunación anti-p53 realizado y publicado ha confirmado la inocuidad y la inmunogenicidad de la vacuna. Sin embargo, ningún ensayo de fase III ha podido validar la eficacia de esta estrategia vacunal.

La solicitante ha descubierto con asombro que la inmunosupresión y la angiogénesis del microentorno de las células infectadas por ciertos virus tal como VIH-1 y del microentorno de las células cancerosas aportan una explicación racional a la ausencia de eficacia de estas estrategias vacunales, ya que estas estrategias anteriores tenían como objetivo la célula cancerosa y no el trastorno de su microentorno.

Ahora bien, mientras que hasta ahora los tratamientos pretenden todos asesinar directamente las propias células cancerosas, es decir las células parenquimatosas, la solicitante ha encontrado que era tanto o incluso más juicioso luchar contra las moléculas producidas en el microentorno extracelular (estromal) del tumor y que favorece el desarrollo de esta última.

Se recuerda que cualquier tejido o tumor está formado por células parenquimatosas que se bañan en un microentorno denominado estroma. Este estroma está constituido a su vez por células estromales (que pueden ser unas células inmunitarias, endoteliales, o fibroblásticas) y por un medio extracelular.

Los trabajos de la solicitante han demostrado en efecto que unos factores solubles segregados por las células infectadas por el VIH-1, en particular la proteína Tat o por las células inmunitarias de pacientes infectados por el VIH en particular la IFN α y el TGF β o producidas por células cancerosas, tales como la proteína E7 de HPV en el cáncer del cuello uterino, o la proteína Tax del HTLV1 en las leucemias ATL o la proteína p53 en el cáncer colorrectal, tenían unas propiedades inmunosupresoras susceptibles de inhibir las reacciones inmunitarias, celulares en los tumores y por lo tanto explicaría la ineficacia de las vacunas anteriores.

El estudio bibliográfico ha permitido reforzar estas observaciones de la solicitante, confirmando la presencia de factores inmunosupresores liberados en el medio extracelular de tumores malignos:

Algunos de estos factores aún no identificados se han producido por

- unas células de cáncer colorrectal (Ebert EC, Roberts AI, O'Connell SM, Robertson FM, Nagase H. Characterization of an immunosuppressive factor derived from colon cancer cells. J Immunol. (1987) 138:2161-8 o Remacle-Bonnet MM, Pommier FJ, Kaplanski S, Rance RJ, Depieds RC. Inhibition of normal allogenic lymphocyte mitogenesis by a soluble inhibitor extracted from human colonic carcinoma. J Immunol (1976) 117:1145-51,
- unas células de glioblastoma (29-Fontana A, Hengartner H, de Tribolet N, Weber E. Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. J Immunol. (1984) 132:1837-44),
- unos melanomas (30. Hersey P, Bindon C, Czerniecki M, Spurling A, Wass J, McCarthy WH. Inhibition of interleukin 2 production by factors released from tumor cells. J Immunol. (1983) 131:2837-42), o
- unas ascitis malignas (Tamura K, Shibata Y, Matsuda Y, Ishida N. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. Cancer Res. (1981) 41:3244-52, Oh SK, Moolten FL. Non specific immunosuppressive factors in malignant ascites: further characterization and possible relationship to erythrocyte receptors of human peripheral T cells. J Immunol. (1981) 127:2300-7).

Otros factores de regulación transcripcional, como se ha referido antes, son de origen celular tal como la proteína p53, acumulada en algunos tumores malignos, en particular colorrectales (Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B, Thomas G. Increased p53 protein content of colorectal tumours correlates with poor survival. Br J Cancer 1992 66:758-64, Gan H, Ouyang Q, Wang Y. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to cell proliferative activity and prognosis. Chung Hua Chung Liu Tsa Chih (1996) 18:244-

6). La proteína p53, liberada por transporte activo mediante vías de secreción que no utilizan la señal peptídica o por difusión pasiva está presente en el medio extracelular, y se ha aislado por cromatografía sobre fibra de vidrio a partir de suero de persona que padece cáncer (Zusman I, Sandler B, Gurevich P, Zusman R, Smirnov P, Tendler Y, Bass D, Shani A, Idelevich E, Pfefferman R, Davidovich B, Huszar M, Glick J. Comparative study of the role of serum levels of p53 antigen and its tumor cell concentration in colon cancer detection. Hum Antibodies Hybridomas. (1996): 123-8, Sandler B, Smirnov P, Tendler Y, Zinder O, Zusman R, Zusman I. Specificity of polyclonal anti-p53 IgG for isolation of the soluble p53 antigen from human serum. Int J Mol Med. 1998 1:767-70).

Unas citoquinas, tales como el TGF β notoriamente inmunosupresor; el VEGF factor de crecimiento angiogénico, la IL 6 pro-inflamatoria o la IL 10 también inmunosupresora, son anormalmente segregadas y liberadas en el medio extracelular de algunas células cancerosas. La solicitante ha demostrado que las células de línea cancerosas SIHA, así como las células DU145 del cáncer de la próstata y las células MT2 de líneas leucémicas producen anormalmente y liberan en el medio extracelular unas citoquinas tales como el VEGF y/o la IL 6, mientras que las células RAJI de líneas leucémicas segregan en el medio extracelular IL 10.

En este contexto, la presente invención tiene por objeto la utilización como medicamento anticanceroso nuevas preparaciones vacunales desprovistas de toxicidad y destinadas a neutralizar la IL 10 producida en el compartimiento estromal extracelular en exceso por las células cancerosas o estromales de tumores malignos.

Los ejemplos de vacunas anti-citoquinas descritos en el documento EP 591 281 se refieren particularmente a vacunas anti-IFN α utilizadas contra el SIDA y otras afecciones inmunitarias. Los ejemplos de inmunogénesis descritos en el documento WO-A-00/03732 derivan de factores de regulación de origen viral tales como las proteínas E7 de HPV 16, Tax de HTLV-1 y de Tat de HIV-1.

En estas nuevas preparaciones vacunales no tóxicas, el inmunógeno está presentado en forma galénica, que permite inducir una reacción inmunitaria que induce preferentemente unos anticuerpos de clase IgG y/o IgA capaces de antagonizar localmente la IL 10 anormalmente presente en el medio extracelular de los tumores y de inhibir los efectos.

La presente invención propone la utilización como medicamento anticanceroso de vacunas dirigidos particularmente contra la proteína IL 10, citoquina inmunosupresora mayor.

Estas vacunas pretenden inducir una reacción inmunitaria con formación de anticuerpos de clase IgG (para todos los cánceres) y sobre todo de clase IgA (para los cánceres epiteliales) con el fin de neutralizar localmente, dentro del tumor, la IL-10 y bloquear sus efectos, lo cual permite así que la inmunidad natural o a la una vacuna dirigida contra los antígenos TAA o TSA funcione normalmente y elimine las células enfermas.

Por ello, la presente solicitud tiene por objeto una vacuna, caracterizada porque contiene a título de principio activo, un inmunógeno que es la IL-10 o que se deriva de la IL-10, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable, que permite la inducción de una reacción inmunitaria sistémica o mucosal con formación de anticuerpos de clases IgG o IgA secretoras dirigida contra el factor natural.

En condiciones de desarrollo, el inmunógeno se deriva de la IL-10 por tratamiento químico, físico, por mutación genética, por acondicionamiento adyuvante o es el producto de una vacunación genética (vacuna con ADN) o es un fragmento proteico o peptídico de dicho factor o también se deriva de dicho fragmento proteico o peptídico.

El inmunógeno estará preferentemente acoplado a una proteína portadora.

En efecto, la solicitante ha descubierto que una medida de este tipo aumenta el número de los sitios auxiliares (helper) y por lo tanto aumenta la respuesta anticuerpo que neutraliza el factor extracelular señalado.

Aún en otras condiciones preferidas de desarrollo, el inmunógeno se deriva de la IL-10 por acoplamiento a una proteína portadora que es la KLH.

Unos tratamientos del inmunógeno que han sido descritos en el documento WO-A-00/03732 pueden ser utilizados en la presente invención para la obtención de una vacuna desprovista de cualquier toxicidad y en particular carente de cualquier carácter inmunosupresor. Pero los inmunógenos pueden también ser utilizados en el estado natural.

Los tratamientos químicos consisten por ejemplo en desintoxicar la proteína natural o recombinante mediante un tratamiento con aldehídos, en particular el formaldehído, aldehído monofuncional y por lo tanto que no actúa por acoplamiento de moléculas, de acuerdo con la desintoxicación de las toxinas tetánicas o diftéricas, o que consisten también en tratamientos que bloquean los grupos sulfidrilos, tales como la carboxamidación, la maleimidación o la carboximetilación, o en cualquier otro tratamiento que bloquea otros residuos aminados como se describe en solicitudes anteriores de la solicitante.

En aún otras condiciones preferidas de desarrollo, el inmunógeno es un mutante del factor natural o un fragmento

del factor natural.

5 Se podrá utilizar un mutante del factor que posee por lo menos el 70%, preferentemente por lo menos el 80% y muy particularmente por lo menos el 90%, de homología con el factor proteico natural o también un fragmento proteico o peptídico del factor. En el caso de un péptido, este será preferentemente transportado por una proteína portadora tal como KLH o el toxoide tetánico. Se podrá utilizar ventajosamente también una proteína portadora en el caso del factor proteico natural o también de un fragmento proteico de éste.

10 Los productos descritos anteriormente utilizados como inmunógenos, con la excepción de los factores naturales, son nuevos, por lo menos la mayoría de ellos. Entran por lo tanto en el ámbito de la invención.

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

20 Las modificaciones genéticas pueden ser obtenidas por ingeniería genética realizando unas inserciones, deleciones o sustituciones de residuos. Los mutantes genéticos podrán o no sufrir un tratamiento químico y/o físico complementario. Las proteínas modificadas anteriores pueden, por ejemplo, ser preparadas a partir de una proteína que tiene una secuencia idéntica o similar a una secuencia peptídica de un factor anterior. Todos estos procedimientos son bien conocidos en el estado de la técnica.

25 Una vacuna con ADN (vacunación genética) podrá comprender un plásmido que comprende un gen promotor de expresión como el de CMV y el gen que codifica para un inmunógeno definido anteriormente (factor natural o derivado de lo cual los fragmentos).

30 Por "que derivan" o "derivar" de factores inmunosupresores/apoptóticos/angiogénicos, se entiende también que el compuesto inmunógeno puede estar constituido por la totalidad o por un fragmento de la proteína de partida o también puede estar en particular acoplado a una proteína portadora como KLH (keyhole limpet hemocyanin) o el tétanos toxoide, directamente o preferentemente por un reactivo bifuncional de acoplamiento.

35 Puede comprender una o varias modificaciones en los aminoácidos de esta proteína o fragmento tales como deleciones, sustituciones, adiciones o funcionalizaciones tales como la acilación de aminoácidos, en la medida en la que estas modificaciones siguen estando en el ámbito precisado anteriormente (ausencia de toxicidad, carácter inmunológico). Por ejemplo, en general, la sustitución de un resto de leucina por un resto de isoleucina no modifica dichas propiedades; las modificaciones deben generalmente referirse a menos del 40% de aminoácidos, en particular a menos del 30%, preferentemente a menos del 20% y muy particularmente a menos del 10% del factor proteico. Es importante que la proteína o el fragmento modificado no sean desnaturalizados 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 natural.

45 De manera general, en lo referente a las modificaciones, la homología o la similitud entre el inmunógeno modificado y la proteína o parte de la proteína inmunosupresora natural, 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, puede referirse en particular al documento WO-A-86/06 414 o al documento EP-A-0 220 273 o también al documento PCT/US86/00831, equivalentes.

50 Un fragmento puede comprender de 8 a 110 aminoácidos por ejemplo, preferentemente de 20 a 110, en particular de 12 a 60, particularmente de 25 a 60, más particularmente de 12 a 40 y muy particularmente de 30 a 50 aminoácidos. Dicho fragmento puede comprender también del o de los lados C o N terminales de 1 a 5 aminoácidos suplementarios, es decir diferentes del segmento de origen. Un fragmento debe además comprender una cisteína por lo menos para poder ser objeto de la carboximetilación.

55 Un fragmento proteico podrá comprender la totalidad de los aminoácidos de la secuencia natural, libre de menos de 20 aminoácidos, preferentemente de menos de 15 aminoácidos, particularmente de menos de 10 aminoácidos y muy particularmente de menos de 5 aminoácidos, incluso un solo aminoácido.

60 Para el acondicionamiento adyuvante, el inmunógeno podrá en particular estar incluido en una emulsión agua en aceite, utilizando por ejemplo ISA 51.

Una preparación vacunal que contiene el inmunógeno anti-inmunosupresor/apoptótico/angiogénico podrá ser administrada en forma galénica apropiada para inducir una respuesta inmunitaria de tipo sistémica por vía intramuscular (IM), subcutánea (SC), intradérmica (ID) o de tipo mucosal por vías intranasales, oral, vaginal o rectal.

65 Una preparación vacunal que contiene el inmunógeno anti-inmunosupresor/apoptótico/angiogénico podrá asimismo contener otros inmunógenos, tales como TAA o TSA de cáncer o unos adyuvantes tales como citoquinas o proteínas

de enterotoxinas, tipo CTB o Lt mutante (LT μ) (Freytag LC, Clements JD, Bacterial toxins as mucosal adjuvants CurrTop Microbiol Immunol; (1999) 236:215-36).

5 Una preparación galénica con objetivo sistémico, administrada por vía SC, IM, ID, podrá ser una emulsión de agua que contiene el inmunógeno, en aceite, o una suspensión de fosfato de calcio que intercala el inmunógeno, o el hidróxido de aluminio que absorbe el inmunógeno.

10 Una preparación galénica que pretende una respuesta inmunitaria mucosal administrada preferentemente por vía nasal u oral, pero también por vía vaginal o rectal, sobre todo para los recordatorios, podrá estar en particular constituida por microesferas de polímeros biodegradables, tales como PLG (poli(lactido-co-glicolidos)), PLA ((poli(lactidos)) y PCL (poli(epsilon-caprolactonas)) en forma de retardo (Baras B. *et al.*, Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a Schistosoma mansoni antigen. Infect Immun. (1999) 67:2643-8) en los que están incluidas las moléculas de antígenos, por suspensiones acuosas de fosfato de calcio que intercala o que adsorbe el antígeno, por nanopartículas, tales como las nanopartículas de quitosano.

15 Las preparaciones vacunales podrán estar envasadas para la vía intranasal en forma de gel con el carbopol como excipiente, de gotas nasales o de spray y para la vía oral en forma de cápsulas gastroresistentes, de grageas o de píldoras gastroresistentes.

20 En el caso de vacuna ADN administrada por vía sistémica o mucosal, la presentación galénica del plásmido podrá ser una suspensión en un líquido fisiológico tal como el PBS fisiológico (tampón fosfato = PBS). Los plásmidos podrán ser incluidos en microesferas de polímeros biodegradables (PLG, PLA, PCL) y administradas en cápsulas gastroresistentes para ingestión (vía oral). El ADN podrá también ser expresado en un vector vivo bacteriano, tipo salmonella o viral tipo adenovirus o poxvirus.

25 La presente solicitud describe asimismo la utilización como de inmunógeno de un factor que es un factor citoquínico o un factor de regulación celular particularmente transcripcional u otro tipo de factor con propiedades inmunosupresoras/apoptóticas/angiogénicas anormalmente liberado en el medio extracelular (estromal) por células cancerosas o estromales de tumores malignos o que se deriva de dicho factor.

30 La presente solicitud describe también la utilización de un inmunógeno que es un factor o que se deriva de un factor citoquínico o de un factor de regulación celular particularmente transcripcional o de otro tipo de factor con propiedades inmunosupresoras/apoptóticas/angiogénicas anormalmente producido por células cancerosas o estromales de tumores malignos para la obtención de un medicamento destinado a una utilización como anticancerígeno por mecanismo de reducción de los efectos, sobre el microentorno de dicha células cancerosas o estromales de tumores malignos, de un factor citoquínico o de un factor de regulación celular particularmente transcripcional o de otro tipo de factor con propiedades inmunosupresoras/apoptóticas/angiogénicas anormalmente producido por dichas células cancerosas o estromales de tumores malignos.

40 La presente solicitud describe finalmente un inmunógeno que es un factor o que se deriva de un factor citoquínico o de un factor de regulación celular particularmente transcripcional o de otro tipo de factor con propiedades inmunosupresoras/apoptóticas/angiogénicas anormalmente liberado en el medio extracelular por las células cancerosas o estromales de tumores malignos para su utilización en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, es decir como medicamento, en particular de vacuna curativa o preventiva.

45 Los inmunógenos descritos poseen propiedades farmacológicas muy interesantes. Tienen en particular notables propiedades antagonistas, reductoras, inhibidoras o en particular neutralizantes, unas propiedades inmunosupresoras/apoptóticas/angiogénicas de factores anormalmente producidos en el medio extracelular (estromal) por las células cancerosas o estromales de tumores malignos a diferencia de los compuestos de la técnica anterior que actúan directamente sobre las células cancerosas de tumores malignos.

50 Estas propiedades son ilustradas a continuación en la parte experimental. Justifican la utilización de las vacunas e inmunógenos anteriormente descritos como medicamento.

55 Los medicamentos descritos encuentran su uso por ejemplo en el tratamiento tanto curativo como preventivo de cánceres de origen epitelial como, por ejemplo, el cáncer colorrectal, el cáncer de la próstata, el cáncer de mama y de origen conjuntivo tales como los sarcomas o de origen sanguíneo tales como los linfomas de tipo Epstein-Barr o las leucemias.

60 La presente descripción tiene asimismo como objeto un procedimiento de inmunización activa de pacientes caracterizado porque se utiliza como 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.

65 Estas inmunizaciones se pueden realizar tanto a título curativo como a título preventivo.

Las condiciones preferidas de desarrollo de las vacunas descritas anteriormente se aplican también a otros objetos descritos anteriormente.

5 Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención.

La figura 1 muestra la inhibición de la proliferación celular por TGF δ expresada en % de proliferación celular ((cpm control/cpm muestra) x 100) con tres concentraciones (30, 10 t 3 ng/ml) de TGF β y de proteína p24. El control corresponde a una concentración de proteína recombinante utilizada igual a 0.

10 La figura 2 muestra el efecto de suero de ratones inmunizados con el inmunógeno VEGF no acoplado o acoplado a KLH según diferentes técnicas de acoplamiento y a 4 diluciones diferentes indicadas en la parte de arriba de la tabla. Los experimentos se llevaron a cabo de izquierda a derecha, con ratones sin tratar previamente, ratones inmunizados con VEGF en el día D60, ratones inmunizados con KLH-glutaraldehído-VEGF pH 9 en el día D60, ratones inmunizados con KLH-SMCC-VEGF en el día D60, ratones inmunizados con KLH-SIAB-VEGF en el día D60. El porcentaje de neutralización se da en las ordenadas.

20 **Ejemplo 1: Vacuna a base del inmunógeno VEGF destinada a inducir una reacción inmunitaria sistémica con formación preferida de anticuerpos específicos de clase IgG (Referencia)**

La vacuna está formada de una emulsión agua en aceite constituida por el 50% de ISA 51 (Seppic, Paris) y por el 50% de una solución acuosa de VEGF (20 a 200 μ g/dosis).

25 **Ejemplo 2: vacuna a base del inmunógeno plasmídico para la vacunación ADN de tipo sistémica IL 10.**

Los plásmidos que codifican para la IL 50 (50 a 200 μ g/dosis) se suspenden en 0,2 a 1 ml de PBS para administración intramuscular.

30 **Ejemplo 3: Vacuna a base del inmunógeno p53 destinada a inducir una reacción inmunitaria de tipo mucosal con formación preferida de anticuerpos anti-p53 de clase IgA. (Referencia)**

El inmunógeno p53 (20 a 100 μ g/dosis) está incluido en un gel de fosfato de calcio en presencia o no de adyuvante LT μ (5 a 20 μ g/dosis) para la instilación intranasal. La preparación se administra por vía intranasal bien en forma de gotas nasales, o bien en forma de un gel por adición de carbopol.

35 **Ejemplo 4: Vacuna a base del inmunógeno IL 10 destinada a inducir una reacción inmunitaria de tipo reacción mucosal con formación preferida de anticuerpos anti-IL10 de clase IgA:**

Se han preparado unas microesferas de PLG que contienen el inmunógeno (100 a 300 μ g/dosis) y un mutante de la toxina LT (5-25 μ g/dosis).

La inclusión del IL 10 y del LT μ se realiza en las microesferas biodegradables según el protocolo de Baras B. *et al.* (Baras B. *et al.*, Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a Schistosoma mansoni antigen. Infect Immun. (1999) 67:2643-8)

45 **Ejemplo 5: Vacuna a base del inmunógeno plasmídico IFN γ para vacunación ADN de tipo mucosal. (Referencia)**

Los plásmidos de IFN γ (100-500 μ g/dosis) en presencia de LT μ (5-20 μ g/dosis) son incluidos en microesferas de PLG según el protocolo descrito por Baras *et al.* La administración por vía oral se realiza por alimentación por sonda o por ingestión de cápsulas gastrorresistentes que contienen las microesferas y un excipiente a base de alginato.

50 **Ejemplo 6: Vacuna a base del inmunógeno VEGF destinada a inducir una reacción inmunitaria sistémica con formación preferida de anticuerpos específicos de clase IgG. (Referencia)**

La vacuna está formada de una emulsión agua en aceite constituida del 50% de ISA 51 (SEPPIC) y del 50% de una solución acuosa de VEGF (20 a 200 μ g/dosis).

El inmunógeno procede de la preparación 3 de VEGF estabilizada por glutaraldehído.

60 **Ejemplo 7: Vacuna a base del inmunógeno VEGF acoplado a KLH destinada a inducir una reacción inmunitaria sistémica con formación preferida de anticuerpos específicos de clase IgG. (Referencia)**

La vacuna está formada de una emulsión agua en aceite constituida del 50% de ISA 51 (SEPPIC) y del 50% de una solución acuosa de VEGF (20 a 200 μ g/dosis).

Ejemplo 8: Vacuna a base del inmunógeno E7 de HPV16 acoplado a KLH para inducir una reacción inmunitaria sistémica. (Referencia)

5 La vacuna está formada de una emulsión agua en aceite del 50% de ISA (SEPPIC, Paris) y del 50% de una solución acuosa de E7 acoplado a KLH (20 a 200 µg/dosis).

Los inmunógenos que sirven para la preparación de las vacunas anteriores se han preparado de la siguiente manera:

10 Preparación 1: Inmunógeno anti IL 6 (Referencia)

Inmunógeno IL 6 derivado de la citoquina recombinante IL 6 por tratamiento con formol seguido de un tratamiento por glutaraldehído:

15 A 1 ml de una solución de IL 6 a 1 mg/ml en un tampón fosfato estéril, se añaden 28 µl de una solución de formol (35%) diluido al 1/10 en un tampón fosfato estéril. Después de la adición de mertiolato al 1/10.000, la mezcla se coloca durante 9 días en una estufa a 37°C. Después, se adiciona de glutaraldehído a la concentración de 0,0026 M. Después de 3 minutos, la mezcla se adiciona de 100 µl de glicina a 50 mg/ml para bloquear los grupos aldehídicos en exceso y se dializa contra un gran volumen de tampón fosfato. El inmunógeno es así estabilizado.

20 Característica de IL 6

25 La antigenicidad de la citoquina recombinante IL 6 tratada con respecto a la de la proteína recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA de R&D (D6050): la citoquina recombinante IL 6 desintoxicada presenta una antigenicidad igual a la antigenicidad de la proteína natural correspondiente.

30 La ausencia de toxicidad *in vitro* se mide mediante un ensayo de proliferación celular. Unas células mononucleadas de la sangre periférica humana son cultivadas en presencia del súper antígeno SEB y en presencia de una dosis de la proteína recombinante IL 6 natural o desintoxicada que corresponde a 10 veces y 30 veces la dosis fisiológica de la citoquina natural. La proliferación celular está expresada en % de proliferación celular [cpm (corte por minuto) control/cpm muestra] x 100). El control corresponde a una concentración de proteína recombinante utilizada igual a 0. Los resultados están presentados en la tabla siguiente:

		% de proliferación celular
IL 6 natural	0 ng/ml	100
IL 6 natural	30 ng/ml	98
IL 6 tratada	30 ng/ml	95

35 La IL 6 tratada utilizada a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB.

Preparación 2: Inmunógeno anti-p53 (Referencia)

40 El inmunógeno p53 se ha desintoxicado por tratamiento con formol según el protocolo descrito por Ramon (Ramon G. Sur le pouvoir flocculant et les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine). C.r. hebdomadaire. Séances Acad. Sci. (1923) 177: 1338-1340), seguido de un tratamiento con glutaraldehído de la proteína p53 recombinante (sc-4246, Santa Cruz) en las condiciones siguientes: a 10 µl de una solución de p53 natural a 1 mg/ml, se añaden 3 µl de una solución de formol diluida al 1/100 en un tampón fosfato estéril. La mezcla se coloca durante 2 días en una estufa a 37°C. Después, se adiciona de 25 µl de glutaraldehído al 1/100. Después de 15 minutos de reacción a temperatura de laboratorio, se añaden 2 µl de glicina 2M para bloquear los grupos aldehídicos en exceso.

50 Característica del inmunógeno p53

La antigenicidad de la proteína recombinante p53 tratada con respecto a la de la proteína recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA de Amersham Pharmacia Biotech (p53 Rapid Format Pantropic Human ELISA, VQIA26): las proteínas p53 natural y tratada presentan una antigenicidad equivalente.

55 Ausencia de toxicidad *in vitro*: la proteína p53 tratada utilizada a dosis diez veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas (0,5 a 5 ng/ml) no modifica la proliferación de células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB o por los anticuerpos anti CD3. La medición de la proliferación se ha realizado mediante el ensayo con ³H-timidina.

60 Preparación 3: Inmunógeno anti VEGF (Referencia)

El inmunógeno VEGF derivado de VEGF (293-VE-010; R&D) se obtiene mediante tratamiento con glutaraldehído en

las condiciones siguientes: a 100 µl de una solución de VEGF natural a 5 µg/ml en un tampón fosfato, se añaden 5 µl de una solución de glutaraldehído diluido al 1/500 en un tampón fosfato estéril. Después de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente, se añaden 2 µl de glicina 1M para bloquear la reacción.

5 Característica del VEGF

La antigenicidad de la citoquina VEGF tratada con respecto a la de la citoquina recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA de R&D (DVE00): las citoquinas natural y tratada presentan una antigenicidad equivalente.

10 La ausencia de toxicidad *in vitro* se ha medido con la ayuda de un ensayo de proliferación celular. Unas células mononucleadas de la sangre periférica humana son cultivadas en presencia del súper antígeno SEB y en presencia de una dosis de la proteína recombinante VEGF natural o tratada que corresponde a 10 veces y 30 veces la dosis fisiológica de la citoquina natural. La proliferación celular está expresada en % de proliferación celular ((cpm control/cpm muestra) x 100). El control corresponde a una concentración de proteína recombinante utilizada igual a 0. Los resultados son presentados en la tabla siguiente:

		% de proliferación celular
VEGF natural	0 ng/ml	100
VEGF natural	30 ng/ml	92
VEGF tratado	30 ng/ml	97

20 La citoquina VEGF tratada utilizada a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activada por SEB.

Preparación 4: Inmunógeno anti-TGFβ (Referencia)

25 El inmunógeno TGFβ derivado de TGFβ es desintoxicado por tratamiento con formol según el protocolo descrito por Ramon (Ramon G, Sur le pouvoir flocculant et les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine). C.r. hebd. Séances Acad. Sci. (1923) 177:1338-1340), seguido de un tratamiento con glutaraldehído, conforme al protocolo descrito para el inmunógeno p53.

Característica del inmunógeno TGFβ

30 El antígeno de la citoquina TGFβ tratada con respecto a la de la proteína recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA R&D (DB100): las citoquinas TGFβ natural y tratada presentan una antigenicidad equivalente.

35 La ausencia de toxicidad de la citoquina TGFβ tratada se ha medido mediante un ensayo de proliferación de células T descrito en el ejemplo A1- Este ensayo muestra que el TGFβ desintoxicado utilizado a dosis fisiológicas de 0,5 a 5 ng/ml no disminuye la proliferación de los linfocitos.

Preparación 5: Inmunógeno anti IL 10

40 a) Inmunógeno IL 10 derivado de IL 10 por tratamiento con formol

45 La IL 10 se obtiene a partir de la proteína de fusión de la IL 10 por tratamiento con formol a 37°C seguido de un tratamiento corto con glutaraldehído, conforme al protocolo descrito para el inmunógeno p53. La proteína de fusión IL 10 se ha producido en *E. coli* a partir de un ADNc clonado en el plásmido de expresión bacteriano prSetA y purificado en forma de una proteína de fusión con Tag His. Esta proteína de fusión purificada es homogénea en electroforesis de acrilamida y en transferencia western.

Característica del inmunógeno IL 10

50 La antigenicidad de la citoquina IL10 tratada con respecto a la de la proteína recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA de R&D (D1000): las citoquinas IL 10 natural y tratada presentan una antigenicidad equivalente.

55 La ausencia de toxicidad *in vitro* se mide mediante un ensayo de proliferación celular. La citoquina IL 10 tratada utilizada a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB.

b) Inmunógeno plasmídico IL 10 para vacunación de ADN

60 El inmunógeno plasmídico IL 10 está representado por un ADNc de IL 10 clonado en el plásmido de expresión bacteriana prSetA.

Preparación 6: Vacuna anti TNF α (Referencia)

Inmunógeno TNF α derivado de TNF α por tratamiento químico

5 El inmunógeno derivado de TNF α (Peprtech Inc., Rocky Hill) se obtiene mediante tratamiento con formol a 37°C seguido de un tratamiento corto con glutaraldehído, conforme al protocolo descrito para el inmunógeno p53.

Característica de TNF α :

10 La antigenicidad de la citoquina TNF α tratada con respecto a la de la proteína recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA de R&D (DTA50): Las citoquinas TNF α natural y tratada presentan una antigenicidad equivalente.

15 La ausencia de toxicidad *in vitro* se mide mediante un ensayo de proliferación celular. La citoquina TNF α tratada utilizada a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB.

Inmunógeno plasmídico TNF α para vacunación ADN

20 El inmunógeno plasmídico TNF α está representado por un ADNc de TNF α clonado en el plásmido de expresión bacteriano prSetA.

Preparación 7: Inmunógenos IFN γ (Referencia)

25 El inmunógeno IFN γ derivado de IFN γ

Este inmunógeno (Péprotech Inc., Rocky Hill) se obtiene mediante tratamiento con formol a 37°C seguido de un tratamiento corto con glutaraldehído, conforme al protocolo descrito para el inmunógeno p53.

30 Característica del inmunógeno:

La antigenicidad de la citoquina IFN γ tratada con respecto a la de la proteína recombinante natural se ha medido con la ayuda de un ensayo ELISA de R&D (DTA50): Las citoquinas IFN γ natural y tratada presentan una antigenicidad equivalente.

La ausencia de toxicidad *in vitro* se mide mediante un ensayo de proliferación celular. La citoquina IFN γ tratada utilizada a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB.

40 Inmunógeno plasmídico IFN γ para vacunación ADN

El inmunógeno plasmídico IFN γ se prepara mediante un ADNc de IFN γ clonado

45 Preparación 8: Inmunógeno KLH-SIAB-VEGF (Referencia)

El acoplamiento de VEGF a la proteína KLH, utilizada como portador tiene por efecto potencializar la inmunogenicidad de VEGF.

50 El acoplamiento se ha realizado por reacción de VEGF reducido con KLH activado por tratamiento mediante el sulfosuccinimidil [4-yodoacetil] aminobenzoato (denominado sulfo-SIAB).

Etapa 1: Reducción de VEGF por DTT

55 Se adicionó 1 mg de VEGF en disolución en 500 μ l de PBS de 40 μ l de una solución de DTT (Ditiotreitol) a 50 mg/ml. La mezcla se conservó durante 2 horas a temperatura ambiente, protegida de la luz, y la mezcla de reacción se filtró a través de una columna de Sephadex G25 (1 x 15 cm) equilibrada en PBS que contiene EDTA-Na₂ 5 mM, pH 7,0.

Etapa 2: Tratamiento de KLH por el sulfo-SIAB

60 El sulfo-SIAB es un brazo separador que permite unir la proteína portadora, aquí KLH, con el inmunógeno VEGF para realizar un conjugado.

65 Se adicionaron 150 μ l de una solución de KLH a 20 mg/ml de 50 μ l de tampón borato 0,1 M - EDTA Na₂-5 mM, pH 8,5, seguido de la adición de 20 μ l de una solución en agua de sulfo-SIAB a 3,4 mg/ml, la reacción tiene lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, bajo una barrera de nitrógeno. La mezcla de

reacción se filtró entonces a través de una columna de Sephadex G25 (1x11 cm) equilibrada con el mismo tampón.

Etapa 3: Acoplamiento de VEGF reducido a KLH-SIAB

5 Se ha mezclado 1 ml de solución de VEGF reducido con 500 µl de KLH-SIAB. La mezcla se incubó, protegida de la luz y a temperatura ambiente, bajo nitrógeno, durante 1 hora, y después durante 15 horas a 4°C.

Después de que la reacción haya sido bloqueada por adición de cisteína a la concentración final de 5 mM, durante 20 minutos, la mezcla se purificó por cromatografía de exclusión.

10

Características del inmunógeno KLH-SIAB-VEGF:

La antigenicidad de VEGF conjugado se reveló comparable con la de VEGF aislado.

15 La ausencia de toxicidad *in vitro* se midió mediante un ensayo de proliferación celular. El conjugado KLH-SIAB-VEGF utilizado a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB.

Preparación 9: Inmunógeno KLH-SMCC-VEGF

20

El acoplamiento de VEGF a la proteína KLH, utilizada como portador tiene por efecto potencializar la inmunogenicidad de VEGF.

25 El acoplamiento se ha realizado por reacción de VEGF reducido con KLH activado por tratamiento por el (sulfosuccinimidil [4-N-maleimidometil]-ciclohexan-1-carboxilato) (sulfo-SMCC).

Etapa 1: Reducción de VEGF por DTT

30 El sulfo-SMCC es un brazo separador que permite unir la proteína portadora, aquí KLH, con el VEGF para formar un conjugado.

35 Se adicionó 1 mg de VEGF en solución en 500 µl de PBS de 40 µl de una solución de DTT a 50 mg/ml. La mezcla se ha conservado durante 2 horas a temperatura ambiente, protegida de la luz, y la mezcla de reacción se ha filtrado a través de una columna de Sephadex G25 (1x15 cm) equilibrada en PBS que contiene EDTA-Na₂ 5 mM, pH 7,0.

Etapa 2: Tratamiento de KLH por el sulfo-SMCC

40 Se han adicionado 150 µl de una solución de KLH a 20 mg/ml de 50 µl de tampón borato 0,1 M - EDTA Na₂-5 mM, pH 8,5, seguido de la adición de 20 µl de una solución en agua de sulfo-SMCC a 3,4 mg/ml, la reacción tiene lugar durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, bajo una barrera de nitrógeno. La mezcla de reacción se filtró entonces a través de una columna de Sephadex G25 (1x11 cm) equilibrada con el mismo tampón.

Etapa 3: Acoplamiento de VEGF reducido con KLH-SMCC

45 Se ha mezclado 1 ml de solución de VEGF reducido con 500 µl de KLH-SMCC. La mezcla se ha incubado, protegida de la luz y a temperatura ambiente, bajo nitrógeno, durante 1 hora, y después durante 15 horas 4°C.

50 Después de que la reacción haya sido bloqueada por adición de cisteína a la concentración final 5 mM, durante 20 min., la mezcla se ha purificado por cromatografía de exclusión.

Característica del inmunógeno KLH-SMCC-VEGF:

La antigenicidad de VEGF conjugado se reveló comparable a la de VEGF aislado.

55 La ausencia de toxicidad *in vitro* se mide mediante un ensayo de proliferación celular, el conjugado KLH-SMCC-VEGF utilizado a dosis 10 veces y 30 veces superiores a las dosis fisiológicas no modifica la proliferación de las células mononucleadas de la sangre periférica humana activadas por SEB.

Preparación 10: Inmunógeno KLH-glutaraldehído-VEGF (Referencia)

60

El acoplamiento tiene por efecto potencializar la inmunogenicidad de la proteína VEGF.

El acoplamiento se ha realizado mediante reacción de la molécula VEGF con KLH activado por el glutaraldehído.

65 Se ha activado mediante diálisis 1 ml de solución de KLH a 10 mg/ml en PBS contra 100 ml de una solución de glutaraldehído al 0,2% en PBS, durante una noche, a 4°C. El exceso de glutaraldehído se ha eliminado por diálisis

de la proteína activada contra 3 cambios de 200 ml de PBS de 2 horas cada uno.

Se añaden a 400 µl de KLH activado (4 mg) 1 mg de una solución a 1 mg/ml de la proteína VEGF en PBS y se agita la mezcla de reacción, durante 1 noche, a 4°C. Los grupos aldehídicos libres son entonces bloqueados por reacción durante 1 hora con 100 µl de glicina 2,5 M y la mezcla se purifica mediante cromatografía de exclusión. La antigenicidad de la proteína VEGF en el conjugado se reveló ligeramente superior a la de VEGF aislado.

Preparación 11: Inmunógeno KLH- glutaraldehído -E7 (Referencia)

El acoplamiento tiene por efecto potencializar la inmunogenicidad de la proteína E7.

El acoplamiento se ha realizado mediante reacción de la molécula E7 con KLH activado por el glutaraldehído a partir de 1 ml de solución de KLH a 10 mg/ml en PBS según el mismo protocolo que el descrito para la preparación 10.

La antigenicidad de la proteína E7 en el conjugado se reveló ligeramente superior a la de E7 aislado.

Preparación 12: KLH- glutaraldehído-IFNα (Referencia)

La IFNα se ha conjugado con KLH en las mismas condiciones que las descritas en la preparación 11 para la proteína E7.

La antigenicidad de IFNα conjugado se reveló ligeramente superior a la de IFNα tratado con glutaraldehído solo.

Estudio farmacológico (Referencia)

A - Presencia en el medio extracelular de tumores malignos, de moléculas que participan a la inmunosupresión, la apoptosis o la angiogénesis del microentorno de las células cancerosas.

Experimento A1:

La proteína p53 que se acumula en los tumores malignos y está presente en los medios extracelulares de los cuales el suero (Zusman I, Sandler B, Gurevich P, Zusman R, Smimoff P, Tendler Y, Bass D, Shani A, Idelevich E, Pfefferman R, Davidovich B, Huszar M, Glick J. Comparative study of the rôle of serum levels of p53 antigen and its tumor cell concentration in colon cancer detection. Hum Antibodies Hybridomas. (1996): 123-8), activa la sobreproducción por los APC de IFNα, mediador de la inmunosupresión, y de TNFα, citoquina que participa en la expresión de las moléculas de adherencia de las células endoteliales y en la apoptosis de las células inmunitarias.

Protocolo experimental

Unos macrófagos, que proceden de la diferenciación de monocitos elutriados cultivados durante 5 días en bolsas de teflón en presencia de GMC-SF (F. Sallusto *et al.*, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med (1994) 179, 1109), son activados con LPS durante 16 horas. Estos macrófagos así activados son después cultivados en presencia de dosis crecientes (0-10 µg/ml) de la proteína recombinante p53 natural (sc-4246, Santa Cruz) y de proteína control) en el medio sin suero durante 24 horas. La proteína control fue la proteína recombinante p24 (proteína de H1V-1, origen ANRS).

Resultados:

La medición de la sobreproducción APC de IFNα y de TNFα en los sobrenadantes (SN) de cultivo de APC se efectúa respectivamente mediante en ensayo biológico estándar de IFNα, utilizando la lisis de las células MDBK por el VSV (S. Rubinstein *et al.*, Convenient assay for interferons. J. Virol (1981) 37, 755) y por un ensayo ELISA de R&D (DTA50, R&D).

El título de IFNα en el sobrenadante corresponde a la inversa de la dilución más fuerte de los sobrenadantes que inducen al 50% de protección de las células contra el efecto citopático de VSV. La medición de TNFα en los sobrenadantes se realiza siguiendo el protocolo descrito por el productor y está expresada en pg/ml. Los resultados son representados en la tabla siguiente

p53 experimental	Título de IFNα (dilución ⁻¹)	TNFα (pg/ml)
10 µg/ml	128	8700
3 µg/ml	64	6200
1 µg/ml	32	5600
0,3 µg/ml	12	2600
0,1 µg/ml	6	1300

p53 experimental	Título de IFN α (dilución ⁻¹)	TNF α (pg/ml)
00 μ g/ml	2	200

p24 control	Título de IFN α (dilución ⁻¹)	TNF α (pg/ml)
10 μ g/ml	2	250
3 μ g/ml	2	200
1 μ g/ml	2	200
0,3 μ g/ml	2	200
0,1 μ g/ml	2	200
00 μ g/ml	2	200

La proteína recombinante p53 natural induce a la sobreproducción de IFN α y de TNF α , mientras que la proteína recombinante p54 utilizada en los controles no induce a ninguna síntesis.

5 Un lisado de cultivo de células de insectos de baculovirus que expresa la proteína p53 ha dado unos resultados similares a los descritos para la proteína recombinante p53 producida en *E. coli*.

Experimentación A2:

10 La citoquina TGF β , liberada en el medio extracelular por unas células cancerosas inhibe la proliferación de células T y activa la producción por los macrófagos de IFN α , citoquina inmunosupresora mayor.

Protocolo experimental

15 Unas células mononucleadas de la sangre periférica humana, aisladas sobre gradiente de Ficoll a partir de sangre periférica de sujeto sano, son cultivadas en presencia del anticuerpo anti-CD3 y en presencia de dosis crecientes (0-30 ng/ml) de la proteína recombinante TGF β activa (240-B-002, R&D) y de dosis crecientes (0-30 ng/ml) de una proteína control, la proteína recombinante p24.

20 La inhibición de la proliferación de las células T se mide con la ayuda de un ensayo de proliferación celular (Lachgar A., Bernard J., Bizzini B., Astgen A., Le Coq H., Fouchard M., Chams V., Feldman M., Richardson M., Rappaport J., Burny A. & J.F. Zagury Repair of the *in vitro* HIV-1-induced immunosuppression and blockade of the generation of functional suppressive CD8 cells by anti-alpha interferon and anti-Tat antibodies. Biomed & Pharmacother. (1996) 50:13-18).

30 La activación de la producción de IFN α por los macrófagos se mide según el protocolo descrito en la experimentación A1. Los macrófagos activados son cultivados en presencia de dosis crecientes (0-1 μ g/ml) de la proteína recombinante TGF β activa y de una proteína control, la proteína recombinante p24, en un medio sin suero durante 24 horas.

Resultados:

Inhibición de la proliferación celular por TGF β :

35 La proliferación celular está expresada en % de proliferación celular ((cpm control/cpm muestra) x 100) con tres concentraciones (30, 10 y 3 ng/ml) de TGF β y de proteína p24. El control corresponde a una concentración de proteína recombinante utilizada igual a 0. Los resultados son presentados en la figura 1:

40 Estos resultados muestran que la proliferación celular está disminuida en una dosis dependiente por el TGF β activo, mientras que no lo es por la p24.

Activación por el TGF β de la sobreproducción de IFN α por los macrófagos.

45 El título de IFN α en los sobrenadantes corresponde a la inversa de la dilución más fuerte de los sobrenadantes que inducen al 50% de protección contra el efecto citopático de VSV. Los resultados son presentados en la tabla siguiente:

TGFp experimental	Título de IFN α
1 μ g/ml	16
300 μ g/ml	8
100 μ g/ml	4
30 μ g/ml	2
00 μ g/ml	0

P24 control	Título de IFN α
1 μ g/ml	0
300 μ g/ml	0
100 μ g/ml	0
30 μ g/ml	0
00 μ g/ml	0

La proteína recombinante TGF β activa induce a la sobreproducción de IFN α , mientras que la proteína recombinante p24 no induce a ninguna síntesis.

5 **Experimento de vacunación 1:**

Vacunación anti-IL 10 del ratón para la inducción de una inmunidad sistémica y mucosal con formación preferida de anticuerpos específicos de clases IgG e IgA.

10 Protocolo de inmunización

Día 0: Inyección IM de una suspensión de inmunógeno plasmídico que expresa IL 10 (100 μ g) en 0,2 ml de PBS preparada en el ejemplo 2

15 Día 7, día 8, día 9: Administración por alimentación por sonda de suspensiones acuosas de microesferas (PLGA) que incluye el inmunógeno IL 10 (100 μ g/dosis) y el adyuvante LT μ (5 μ g/dosis).

Los ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

20 Seguimiento:

Se sacrifican los animales 15 días después de la última inmunización y se constata la ausencia de toxicidad (medida por la ausencia de signos clínicos (comportamiento; pelos; peso) y por el examen anatómico después de la autopsia.

25 Reacción inmunitaria ensayada por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG e IgA, medida por ELISA y expresada por la densidad óptica 15 días después de la última alimentación por sonda.

	Ratones control (D.O)	Ratones inmunizados (D.O)
Ac anti IL 10 clase IgG	0,2	0,920
Ac anti IL 10 clase IgA	0,1	0,780

30 Resultados:

Inocuidad clínica y ausencia de lesiones anatómicas.

Presencia de anticuerpos (Ac) anti IL 10 de tipo IgG y de tipo IgA en el suero.

35 Experimento de vacunación 2: (Referencia)

Vacunación anti-VEGF del ratón por la inducción de una inmunidad sistémica y mucosal con formación preferida de anticuerpo específico de clase IgG e IgA.

40 Protocolo de inmunización

- día 0: inyección IM de una suspensión de inmunógeno VEGF (20 μ g) en ISA 51 preparada en el ejemplo 1.
- día 7, día 14, día 21: administración intranasal con la ayuda de una pipeta Hamilton de 10 μ l de una suspensión acuosa que contiene 20 μ g de inmunógeno y 5 μ g de LT μ intercalado en un gel de fosfato de calcio.

Los ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

50 Seguimiento:

Se sacrifican los animales 15 días después de la última inmunización y se constata la ausencia de toxicidad (medida por la ausencia de signos clínicos (comportamiento; pelos; peso) y por el examen anatómico después de la autopsia.

55 Reacción inmunitaria ensayada por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG e IgA, medida por ELISA y expresada por la densidad óptica 15 días después de la última instilación.

	Ratones control (D.O)	Ratones inmunizados (D.O)
Ac anti VEGF clase IgG	0,27	1,64
Ac anti VEGF clase IgA	0,15	1,118

Resultados:

5 Inocuidad clínica y ausencia de lesiones anatómicas.

Presencia de anticuerpos anti VEGF de tipo IgG y de tipo IgA en el suero.

Experimento de vacunación 3: (Referencia)

10 Vacunación anti p53 del ratón por la inducción de una inmunidad sistémica y mucosal con formación preferida de anticuerpo específico de clase IgG e IgA.

Protocolo de inmunización

- 15
- día 0: inyección IM de una suspensión de inmunógeno p53 (20 µg) en ISA 51 preparada en el ejemplo 1.
 - día 7, día 14, día 21: administración intranasal con la ayuda de una pipeta Hamilton de 10 µl de una suspensión acuosa que contiene 20 µg de inmunógeno y 5 µg de LTµ intercalado en un gel de fosfato de calcio.
- 20

Los ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Seguimiento:

25 Se sacrifican los animales 15 días después de la última inmunización y se constata la ausencia de toxicidad (medida por la ausencia de signos clínicos (comportamiento; pelos; peso) y por el examen anatómico después de la autopsia.

30 Reacción inmunitaria ensayada por la presencia en el suero y en la saliva de anticuerpos de tipo IgG e IgA, medida por ELISA y expresada por la densidad óptica 15 días después de la última instilación.

Resultados

35 Inocuidad clínica y ausencia de lesiones anatómicas.

Presencia de anticuerpos anti p53 de tipo IgG y de tipo IgA en el suero y en la saliva.

suero	Ratones control (D.O)	Ratones inmunizados (D.O)
Ac anti p53 clase IgG	0,184	1,492
Ac anti p53 clase IgA	0,208	1,071

saliva	Ratones control (D.O)	Ratones inmunizados (D.O)
Ac anti p53 clase IgG	0,184	1,5
Ac anti p53 clase IgA	0,208	0,980

40 **Experimento de vacunación 4: (Referencia)**

Vacunación anti-IL 6 del ratón por la inducción de una inmunidad sistémica con formación de anticuerpo específico de clase IgG.

45 Protocolo de inmunización

- día 0: inyección IM de una suspensión de inmunógeno IL 6 (20 µg) en ISA 51 preparada en el ejemplo 1.
- día 21: Recuerdo por vía IM de una emulsión de IL 6 (5 µg) en ISA 51.

50 Los ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Seguimiento:

55 Se sacrifican los animales 15 días después del recuerdo y se constata la ausencia de toxicidad (medida por la ausencia de signos clínicos (comportamiento; pelos; peso) y por el examen anatómico después de la autopsia.

Reacción inmunitaria ensayada por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG e IgA, medida por ELISA y expresada por la densidad óptica 7 días después del recordatorio.

	Ratones control (D.O)	Ratones inmunizados (D.O)
Ac anti IL 6 clase IgG	0,280	2,356
Ac anti IL 6 clase IgA	0,230	0,320

5 Resultados:

Inocuidad clínica y ausencia de lesiones anatómicas.

Presencia de anticuerpos anti IL 6 de tipo IgG en el suero.

10

Experimento de vacunación 5: (Referencia)

Vacunación anti-IL 6 del ratón por la inducción de una inmunidad sistémica y mucosal con formación preferida de anticuerpo específico de clase IgG e IgA.

15

Protocolo de inmunización

- día 0: inyección IM de una suspensión de inmunógeno IL 6 (20 µg) en ISA 51 preparada en el ejemplo 1.
- día 7, día 8, día 9: administración por alimentación por sonda de microesferas de PLG que contienen el inmunógeno (100 µg/dosis) y el adyuvante LTµ (5 µg/dosis).

20

Los ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

25 Seguimiento:

Se sacrifican los animales 15 días después de la última alimentación por sonda y se constata la ausencia de toxicidad (medida por la ausencia de signos clínicos (comportamiento; pelos; peso) y por el examen anatómico después de la autopsia.

30

Reacción inmunitaria ensayada por la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG e IgA, medida por ELISA y expresada por la densidad óptica 15 días después de la última alimentación por sonda.

	Ratones control (D.O)	Ratones inmunizados (D.O)
Ac anti IL 6 clase IgG	0,250	1,400
Ac anti IL 6 clase IgA	0,175	1,62

35 Resultados:

Inocuidad clínica y ausencia de lesiones anatómicas.

Presencia de anticuerpos anti IL 6 de tipo IgG y de tipo IgA en el suero.

40

Ejemplo de vacunación 6: vacunación anti-VEGF por el conjugado KLH-SIAB-VEGF. (Referencia)

La actividad inmunogénica (humoral) del conjugado KLH-SIAB-VEGF con respecto a la del VEGF natural se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

45

En el día D0, un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,2 ml (50 µg) de una emulsión en adyuvante completo de Freund por vía intramuscular. Una inyección de recuerdo de 5 µg en adyuvante incompleto de Freund se da a D21 y D60.

50 Se efectúa una extracción sanguínea a nivel retro-orbital sobre cada ratón antes de la primera inyección a D-2.

Tres ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Tres ratones reciben 100 µg de la preparación y se estudia la ausencia de síntomas de enfermedad durante los 7 días siguientes a la inyección.

55

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

La ausencia de toxicidad se mide por la ausencia de signos clínicos: (comportamiento, pelos, peso) y por examen

anatómico después de la autopsia.

Resultados:

5 Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 100 µg de la preparación manifiesta síntoma de enfermedad durante los 7 días tras la inyección.

Los ratones inmunizados tanto por el conjugado KLH-SIAB-VEGF como por el VEGF únicamente no presentan ningún signo clínico y ninguna lesión anatómica.

10 La reacción inmunitaria se mide por:

15 a) la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra la proteína recombinante VEGF natural, medida por ELISA y expresada en el título (la inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3).

	Título	
	D-2	D 72
ratón control :		
ratón 1	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón 2	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
ratón 3	<500 ⁻¹	<500 ⁻¹
Ratón inmunizado con VEGF:		
ratón 4	<500 ⁻¹	500 ⁻¹
ratón 5	<500 ⁻¹	1000 ⁻¹
ratón 6	<500 ⁻¹	750 ⁻¹
Ratón inmunizado con el conjugado KLH-SIAB-VEGF:		
ratón 7	<500 ⁻¹	>64000 ⁻¹
ratón 8	<500 ⁻¹	>64000 ⁻¹
ratón 9	<500 ⁻¹	>64000 ⁻¹

20 Los ratones inmunizados con el conjugado KLH-SIAB-VEGF presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG anti-VEGF más importantes que los de los ratones inmunizados con el VEGF únicamente.

Ejemplo 7: comparación de las actividades neutralizantes de los sueros de ratones inmunizados por el conjugado KLH-SIAB-VEGF o por VEGF natural. (Referencia)

25 La actividad neutralizante de estos anticuerpos se ha medido con la ayuda del ensayo biológico estándar de la actividad de VEGF. Diferentes diluciones de sueros (1/100 - 1/800) extraídas a D-2 y D72 son incubadas durante 2 horas con 10 ng/ml de VEGF natural. Estas diluciones son después depositadas sobre células endoteliales (HUVEC) cultivadas en pocillos de fondo plano de una placa de microcultivo a razón de 3000 células/pocillos. El cultivo celular se prosigue a 37°C en atmósfera húmeda cargada al 5% de CO₂ durante 6 días. 18 horas antes del final de la incubación, se añaden 0,5 µCi de timidina tritiada/pocillo.

30 Los resultados son dados en % de neutralización.

		% de neutralización			
		1/100	1/200	1/400	1/800
Ratones inmunizados con VEGF:					
ratón 4	D-2	0	0	0	0
	D72	15	0	0	0
ratón 5	D-2	0	0	0	0
	D 72	20	0	0	0
ratón 6	D-2	0	0	0	0
	D 72	15	0	0	0
Ratones inmunizados con KLH-VEGF					
ratón 7	D-2	0	0	0	0
	D 72	100	100	100	100
ratón 8	D-2	0	0	0	0
	D 72	100	100	100	100
ratón 9	D-2	0	0	0	0
	D72	100	100	100	100

Los anticuerpos inducidos por el conjugado KLH-VEGF tienen un poder neutralizante más importante que el de los

anticuerpos inducidos por el VEGF.

Ejemplo 9: comparación de las actividades neutralizantes de los ratones inmunizados con, bien el VEGF natural, o bien el conjugado KLH-SIAB-VEGF, o bien el conjugado KLH-SMCC-VEGF, o bien el KLH-gluta-VEGF. (Referencia)

La actividad neutralizante se determina según el mismo protocolo experimental que el descrito en el ejemplo 8. Como en el protocolo de experimentación del ejemplo 7, los ratones se han inmunizado a D0, D21 y a D60.

La figura 2 resume los resultados obtenidos: se observa que a partir del D30 aparecen unas neutralizaciones importantes para los conjugados KLH-SIAB-VEGF y KLH-SMCC-VEGF. Se necesita esperar al D70 para obtener unas neutralizaciones con el conjugado KLH-glutaraldehído-VEGF. Por el contrario, no se observa neutralización ninguna para el VEGF natural.

Ejemplo 10: vacunación con el conjugado KLH-glutaraldehído-E7. (Referencia)

La actividad inmunogénica (humoral y celular) del conjugado KLH-E7 con respecto a la de la proteína E7 se ha estudiado en el ratón balb c de 18-20 g.

En el día D0, un grupo de 3 ratones recibe una inyección de 0,2 ml (50 µg) de una emulsión en ACF por vía intramuscular. Una inyección de recuerdo de 5 µg en AIF se da en D21 y D60.

Una extracción sanguínea a nivel retro-orbital se efectúa sobre cada ratón antes de la primera inyección en D-2.

Tres ratones control reciben las mismas preparaciones sin inmunógeno.

Tres ratones reciben 100 µg de la preparación, y se estudia la ausencia de síntomas de enfermedad durante los 7 días siguientes a la inyección.

Los ratones son sacrificados 12 días después de la última inmunización.

La ausencia de toxicidad se mide por la ausencia de signos clínicos: (comportamiento, pelos, peso) y por examen anatómico después de la autopsia.

Resultados:

Ninguno de los 3 ratones inmunizados con 100 µg de la preparación manifiesta síntomas de enfermedad durante los 7 días siguientes a la inyección.

Los ratones inmunizados tanto por el conjugado KLH-E7 como por la proteína E7 únicamente no presentan ningún signo clínico y ninguna lesión anatómica.

La reacción inmunitaria se mide por:

1- la presencia en el suero de anticuerpos de tipo IgG dirigida contra la proteína recombinante E7 natural, medida por ELISA y expresada en el título (la inversa de la dilución que da una densidad óptica superior a 0,3).

	Título	
	D-2	D72
ratones control:		
ratón 1	<500 ⁿ	<500 ⁿ
ratón 2	<500 ⁿ¹	<500 ⁿ
ratón 3	<500 ⁿ	<500 ⁿ
Ratones inmunizados con la proteína E7:		
ratón 4	<500 ⁿ¹	32 000 ⁿ¹
ratón 5	<500 ⁿ¹	64 000 ⁿ¹
ratón 6	<500 ⁿ¹	48 000 ⁿ¹
Ratones inmunizados con el conjugado KLH-E7:		
ratón 7	<500 ⁿ¹	>64 000 ⁿ¹
ratón 8	<500 ⁿ¹	>64 000 ⁿ¹
ratón 9	<500 ⁿ¹	>64 000 ⁿ¹

Los ratones inmunizados con el conjugado KLH-E7 presentan unos títulos de anticuerpos de tipo IgG anti-E7 más importantes que los de los ratones inmunizados con la proteína E7 únicamente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna caracterizada porque contiene a título de principio activo un inmunógeno que es la IL-10 o que se deriva de la IL-10 por tratamiento químico, físico, por mutación genética, por acondicionamiento adyuvante, o es un plásmido que comprende un gen promotor de expresión y el gen que codifica la IL-10 o un inmunógeno que se deriva de la IL-10 por mutación genética, o es un fragmento proteico o peptídico de 8 a 110 aminoácidos de dicho factor IL10, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable que permite la inducción de una reacción inmunitaria sistémica o mucosal con formación de anticuerpos neutralizantes de clase IgG o IgA secretora dirigidos contra el factor IL10 natural.
- 10 2. Vacuna según la reivindicación 1, caracterizada porque el inmunógeno se deriva de la IL10 por acoplamiento a una proteína portadora que es el KLH.
- 15 3. Vacuna según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque contiene, a título de principio activo, un inmunógeno que es un mutante del factor natural IL10 o un fragmento del factor natural IL10.
- 20 4. Utilización de un inmunógeno que es la IL10 o que se deriva de la IL 10 por tratamiento químico, físico, por mutación genética, por acondicionamiento adyuvante, o es un plásmido que comprende un gen promotor de expresión y el gen que codifica la IL-10 o un inmunógeno que se deriva de la IL-10 por mutación genética, o es un fragmento proteico o peptídico de 8 a 110 aminoácidos de dicho factor IL10 para la obtención de un medicamento destinado a una utilización como anticancerígeno por mecanismo de reducción de los efectos, sobre el microentorno de dichas células cancerosas o estromales de tumores malignos, del factor citoquinico IL10.

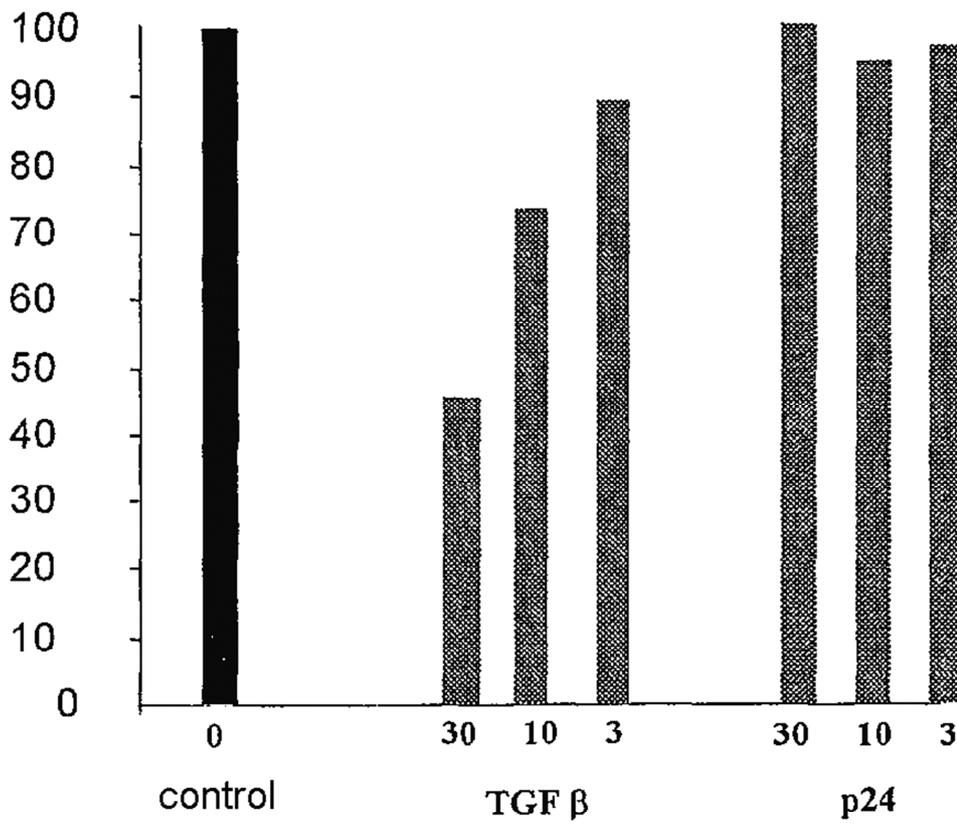


Fig. 1

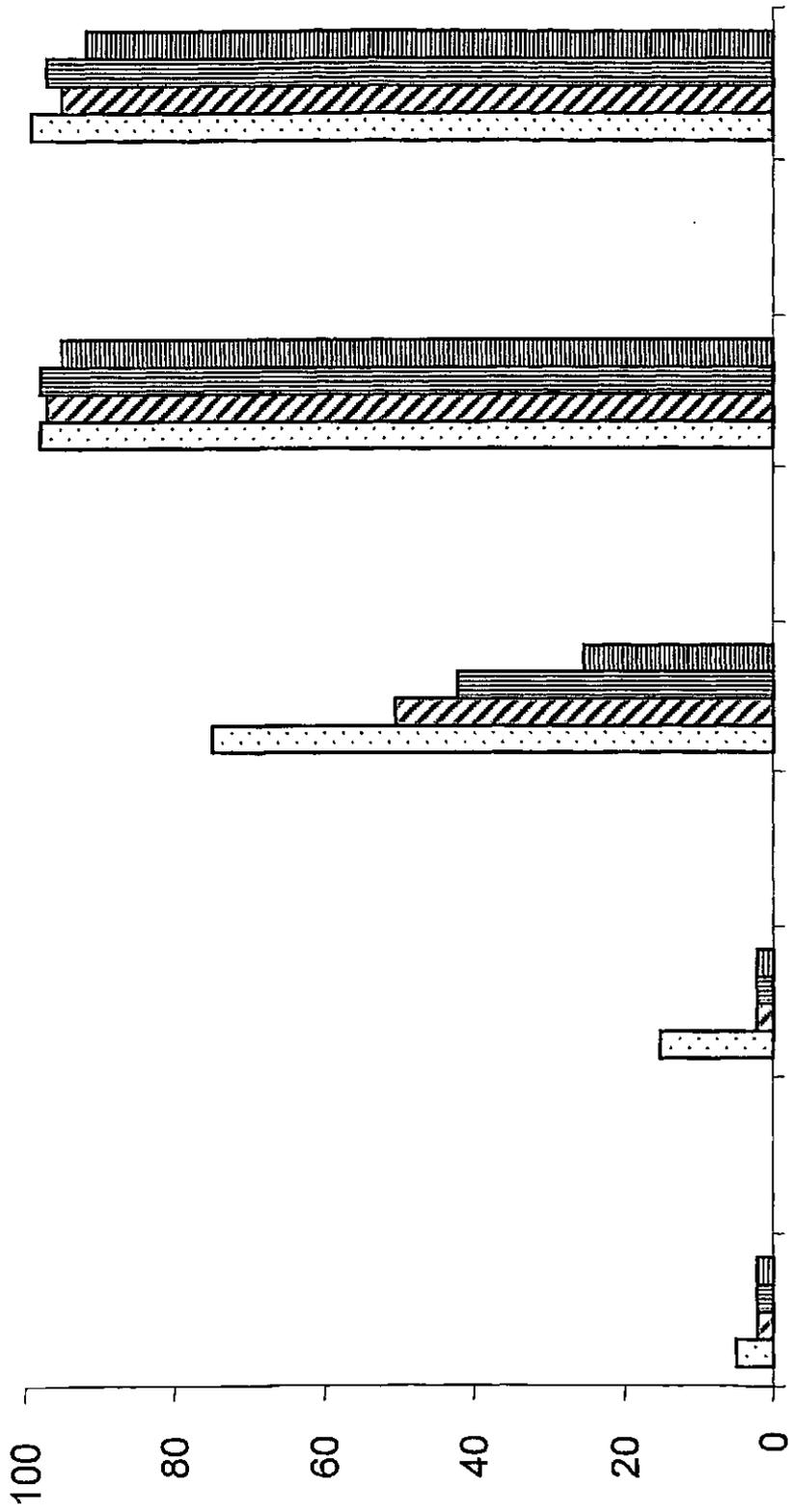


Fig. 2