

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 861**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2007** **E 07855984 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2119453**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas capaces de inducir la apoptosis en células tumorales, útiles para el diagnóstico y tratamiento de leucemia linfocítica crónica-B**

30 Prioridad:

26.12.2006 CU 20060249

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

12.08.2015

73 Titular/es:

CENTRO DE INMUNOLGÍA MOLECULAR (100.0%)
Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa
Ciudad de la Habana 11600, CU

72 Inventor/es:

MONTERO CASIMIRO, JOSÉ ENRIQUE;
ALONSO RAMÍREZ, RUBY y
PÉREZ RODRIGUES, ROLANDO

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 542 861 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

Composiciones farmacéuticas capaces de inducir la apoptosis en células tumorales, útiles para el diagnóstico y tratamiento de leucemia linfocítica crónica-B

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un Anticuerpo Monoclonal humanizado que reconoce el antígeno de diferenciación leucocitaria CD6, capaz de inducir apoptosis en las células tumorales, útil para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Crónica de Células B.

Descripción de la técnica anterior.

La relevancia terapéutica de los anticuerpos monoclonales (MAb) ha sido validada en la práctica médica. Particularmente en el cáncer, los MAb pertenecen al arsenal terapéutico actual en pacientes con diferentes tipos de tumores (Weiner, L.M. et al. (2006) Hum Antibodies 15(3):103; Imai, K. et al. (2006) Nat Rev Cancer 6(9):714).

La apoptosis es un mecanismo biológico natural de muerte celular; sin embargo, se puede inducir terapéuticamente. La apoptosis representa una forma relevante para alcanzar el control del crecimiento de células tumorales y constituye un mecanismo de acción reivindicado por varios medicamentos, incluyendo los MAb con uso terapéutico en pacientes con varios tipos de tumores. En consecuencia, la búsqueda de fármacos con la capacidad de promover la muerte celular mediada por apoptosis se vuelve relevante para la oncología médica (Cartron, G. et al. (2004) Blood 104:2635).

Los síndromes linfoproliferativos y en particular de la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) constituye un problema de salud actual. La B-CLL es la leucemia con mayor prevalencia en el mundo occidental y no hay disponible un fármaco terapéutico con efectos curativos (Chiorazzi, N. et al. (2005) N Engl J Med 352(8):804; Herishanu, Y. et al. (2005) Transfus Apher Sci 32 (1):85). Actualmente, el uso de mAb capaz de eliminar las células tumorales es una opción terapéutica relevante en estos pacientes (Robak, T. (2005) Transfus Apher Sci 32(1):33). Sin embargo, una desventaja importante de este enfoque, basado en el uso de MAb específicos para CD52 y CD20, resulta en su efecto terapéutico anti-tumor muy limitado que induce también la eliminación de los linfocitos normales del individuo. (Nuckel, H. et al. (2005) Eur J Pharmacol 514 (2-3):217; Cartron, G. et al. (2004) Blood 104:2635). La falta de reconocimiento específico promueve una linfopenia prolongada que constituye un factor de riesgo de una aparición frecuente de infecciones en los pacientes tratados, que ya son sensibles a ellos debido a las características inherentes a este tipo de cáncer (Boye, J. et al. (2003) Ann Oncol 14(4):520; Cartron, G. et al. (2004) Blood 104:2635; Potter, M. (1999) 12(4):359; Ravandi, F. et al. (2006) Cancer Immunol Immunother 55(2):197).

Las células tumorales de pacientes con B-CLL expresan marcadores de superficie celulares característicos de los linfocitos B normales (por ejemplo: CD19 y el CD20). En particular, la aparición de las células tumorales se ha asociado a los linfocitos B de la sangre periférica que coexpresan el antígeno de diferenciación leucocitaria CD5 (Herishanu, Y. et al. (2005) Transfus Apher Sci 32(1):85). CD5 es un marcador distintivo para la B-CLL pero no definitivo, ya que sólo puede representar un marcador circunstancial de una subpoblación de células tumorales en sangre periférica, y sigue siendo difícil de alcanzar si los que se originan en la médula ósea o proceden de una fuente extra-medular. (Caligaris-Cappio, F. et al. (2004) Hematol Oncol Clin N Am 18:849).

El antígeno de diferenciación leucocitaria CD6 es una molécula estudiada limitadamente y está caracterizada pobremente. CD6 como una glicoproteína de superficie se expresa principalmente en linfocitos T. Básicamente, se considera que en esas células constituyen un receptor con funciones co-estimuladoras, pero se conoce el mecanismo subyacente (Aruffo, A. et al. (1997) Immunol Today 18 (10):498; Patel, D.D. (2000) J Biol Regul Homeost Agents 2000 14(3):234). La expresión de CD6 en timocitos maduros se ha asociado a su resistencia a la apoptosis en los procesos de maduración de linfocitos en ese órgano linfóide (Singer N.G. et al. (2002) Int Immunol. 14(6):585).

Curiosamente, la molécula CD6 se expresa en una subpoblación menor de los linfocitos B de la sangre periférica de individuos normales, pero hay una comprensión limitada sobre el origen y la caracterización funcional en esas células. Adicionalmente, las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con B-CLL también expresan la molécula CD6. Se considera que la molécula CD6 se co-expresó con la molécula CD5, pero de manera diferente a esa molécula, CD6 ha sido analizada solo eventualmente en muestras de pacientes con B-CLL.

Además, el reconocimiento de la molécula CD5 con Anticuerpos Monoclonales específicos inducen la apoptosis en células tumorales de pacientes con B-CLL, pero sólo en un subgrupo de ellos (Pers, J.O. et al. (2002) Leukemia 16:44).

La molécula CD6 se reconoce por el MAb ior-t1A murino. En un estudio anterior con muestras de pacientes con B-CLL, se encontró que el ior-t1A MAb murino inhibe la apoptosis inducida por un anticuerpo anti-IgM en los linfocitos B. (Osorio, L.M. et al. (1997) Blood, 89(8):2833). Por otra parte, las composiciones terapéuticas de este MAb anti-CD6 murino tienen efecto terapéutico en la Psoriasis (Montero, E. et al. (1999) Autoimmunity 29(2):155).

Posteriormente, mediante métodos de ingeniería genética (EP 0699755) se obtuvo una versión humanizada de ese MAb humano anti-CD6 murino, designado T1h (EP 0807125).

Usando el T1h humanizado de MAb encontramos que reconoce las moléculas CD6 expresadas en las células tumorales de la sangre periférica y, sorprendentemente, también en células de médula ósea de pacientes con B-CLL. Por otra parte, T1h MAb también reconoce las células tumorales que no expresan la molécula CD5 haciendo el CD6 un marcador tumoral que incluye la subpoblación CD5. Además, el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h induce la apoptosis en células tumorales de pacientes con Leucemia linfocítica crónica de células B, pero no en linfocitos normales.

La novedad de la presente invención consiste en la generación de composiciones terapéuticas que comprenden Anticuerpos Monoclonales anti-CD6, para su aplicación en pacientes con Síndromes Linfoproliferativos y en particular en los pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B. Sorprendentemente, el reconocimiento de la molécula CD6 con el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h, induce la muerte celular apoptótica en células tumorales de pacientes con Síndromes Linfoproliferativos que expresan la molécula CD6 y en particular en los linfocitos B de tumores de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B, que conducen al uso terapéutico de T1h MAb en este tipo de tumores. Además, el tratamiento con T1h MAb puede sensibilizar las células malignas al efecto de fármacos citotóxicos que pueden facilitar el uso combinatorio del Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h con radioterapia, agentes quimioterapéuticos u otras bioterapias.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas de Anticuerpos Monoclonales que reconocen el antígeno humano CD6, eficaces en el tratamiento de pacientes con Trastornos Linfoproliferativos. Más particularmente, la presente invención comprende el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h, que reconoce el antígeno de diferenciación de leucocitos humanos CD6 y su uso para el diagnóstico y tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de Células B.

El término "Anticuerpo Monoclonal humanizado" se refiere a un Anticuerpo Monoclonal obtenido por métodos de ingeniería genética como se describe en la patente No. 0699755 (E.P. Bul). Es un objeto de la presente invención, una composición terapéutica que comprende el T1h MAb humanizado obtenido a partir del hibridoma IOR-T1A con No. de depósito ECACC 96112640, capaz de inducir apoptosis en las células malignas de células B de pacientes con leucemia linfocítica crónica mediante el reconocimiento de la molécula CD6, sola o en combinación con cualquiera de los agentes seleccionados entre el grupo de:

- Agentes quimioterapéuticos tales como fludarabina

- Anticuerpos monoclonales específicos a la moléculas de superficie de linfocitos malignos tales como anticuerpos anti-CD20.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también comprenden un excipiente apropiado que sería una solución reguladora fisiológica, y se pueden administrar en la forma de inyecciones en un intervalo de dosis de 0.05 a 1 mg/Kg de peso corporal.

1.- Generación de composiciones farmacéuticas que comprenden el Anticuerpo Monoclonal T1h anti-CD6 humano humanizado.

El Anticuerpo Monoclonal T1h CD6 anti-humano humanizado se obtuvo a partir del hibridoma IOR-T1A con No. de depósito ECACC 96112640, como se describe en (EP0 807 125 A2). La composición farmacéutica de la presente invención comprende el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h adicionalmente; esta composición comprende como un excipiente adecuado una solución reguladora fisiológica, similar a otros utilizados para Anticuerpos Monoclonales terapéuticos para uso intravenoso, como se describe en EP0807125. La composición de la presente invención se administra en la forma de inyecciones en un intervalo de dosis de 0.05 a 1 mg/Kg de peso corporal

2.- Caracterización del reconocimiento específico del Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h.

Las células mononucleares de sangre periférica y las células de la médula ósea de los pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de células B se tiñen con un conjugado antihumano CD19 MAb FITC. Después, las células se incuban con los siguientes Anticuerpos Monoclonales: Anticuerpo Monoclonal anti-humano CD6 conjugado con biotina (T1h) o anti- humano CD5 conjugado con PE-Cy5 (Pharmingen) o anti-humano CD20 conjugado con biotina (Rituximab-Rx). El enlace de los anticuerpos biotinilados se detecta con un conjugado de estreptavidina, PE-Cy5.5. Al menos 10 000 células vivas se adquieren en un Citómetro de Flujo FACScan. Las células muertas se excluyen con la tinción de Yoduro de propidio.

3.- Caracterización del efecto antitumoral del Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h en células de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de células B.

Células mononucleares de sangre periférica de individuos normales o de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B son tratados in vitro con 0.1 µg/mL del Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h o un control de isotipo (Anticuerpo Monoclonal R3h) durante 18 horas a 37 °C y 5% de CO₂. A continuación, las células se lavaron y se incuban con Anexina V conjugada con FITC, durante 10 min a temperatura ambiente. Después, las células se tiñeron con Yoduro de propidio (PI) y se obtuvieron en un citómetro de flujo FACScan. Las células apoptóticas se definen como Anexina V +/PI-.

Ejemplos:

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención. El Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h anti-CD6 humano se obtuvo a partir del hibridoma IOR-T1A con No. de depósito ECACC 96112640, como se describe en (EP 0 807 125 A2).

Ejemplo 1: El Anticuerpo Monoclonal humanizado anti-CD6 humano T1h reconoce las células malignas de la sangre periférica de los pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B.

Se evaluó el reconocimiento de T1h MAb en células mononucleares de sangre periférica de 19 pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B y se determinó la expresión de la molécula CD6 en las células B definida mediante los marcadores CD19 y CD20. Además, se comparó la expresión de los marcadores celulares con muestras procedentes de individuos normales (Figura 1). El estudio se realizó por citometría de flujo usando un FACScan para analizar las muestras. Los valores normales se representan como cuadrados rellenos rojos en la Figura 1.

Ejemplo 2: El Anticuerpo Monoclonal humanizado anti-CD6 humano T1h, reconoce las células malignas de la médula ósea de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B.

Se evaluó el reconocimiento de T1h MAb en células mononucleares de sangre periférica de 4 pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B y se determinó la expresión de la molécula CD6 en las células B definida mediante los marcadores CD19 y CD20. Además, se comparó la expresión de los marcadores celulares con muestras procedentes de individuos normales (Figura 2). El estudio se realizó por citometría de flujo usando un FACScan para analizar las muestras.

Ejemplo 3: El Anticuerpo Monoclonal humanizado anti-CD6 humano T1h, reconoce las células malignas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B que no expresan la molécula CD5.

Se evaluó el reconocimiento de T1h MAb en las células mononucleares de sangre periférica (Figura 3a) y células de médula ósea (Figura 3b) de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B y determinó la co-expresión de las moléculas CD6 y las moléculas CD5 en células malignas. La Muestra 1 representa un paciente con CD6+CD5+células tumorales, y la Muestra 2 representa un paciente con CD6 + CD5-células tumorales. El estudio se realizó por citometría de flujo usando un FACScan para analizar las muestras.

Ejemplo 4: El Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h induce la muerte celular por apoptosis de las células malignas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B.

Se evaluó la capacidad de la Anticuerpo Monoclonal humanizado T1 h para inducir la muerte celular apoptótica de las células malignas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B. Después de la incubación in vitro de las células tumorales con el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1, se determinó el porcentaje de células en apoptosis siguiendo los criterios que fueron positivos para la tinción con anexina V y tinción negativa de Yoduro de propidio. La dexametasona (Dex) y el rituximab (Rx, un Anticuerpo Monoclonal anti-CD20) se utilizaron como controles positivos. El Anticuerpo Monoclonal humanizado R3h (isotipo IgG1, receptor específico del Factor de Crecimiento Epidérmico anti-humano) se utilizó como un control negativo. Los resultados (Figura 4) se compararon con las células sin tratamiento (w/o tratamiento). El estudio se realizó por citometría de flujo usando un FACScan para analizar las muestras.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1-

- 5 Expresión de CD6 definida por el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h, en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B. Un potencial antígeno específico del tumor.

Figura 2-

- 10 Expresión de CD6 definida por el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h, en las células de la médula ósea de los pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B. Un potencial antígeno específico del tumor.

Figura 3-

- 15 Expresión de CD6 definida por el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1h, en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de células B que son negativas para la expresión de la molécula CD5.

Figura 4-

- 20 Inducción de la muerte celular apoptótica de las células malignas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de Células B con el Anticuerpo Monoclonal humanizado T1 h.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición farmacéutica útil para uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de Células B, en donde la composición comprende un Anticuerpo Monoclonal humanizado que reconoce el antígeno de diferenciación leucocitaria CD6, capaz de inducir apoptosis en células tumorales, y un excipiente apropiado y en donde el Anticuerpo Monoclonal humanizado anti-CD6 es el anticuerpo humanizado T1h, a partir del hibridoma secretor de IOR-T1A con No. de depósito ECACC 96112640.
- 10 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el T1h humanizado que induce apoptosis de los linfocitos B malignos, sola o en combinación con cualquier agente seleccionado entre el grupo de:
 - Agentes quimioterapéuticos,
 - 15 - Anticuerpos monoclonales específicos a las moléculas de superficie de linfocitos malignos.
- 20 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el agente quimioterapéutico es el fosfato de fludarabina.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el Anticuerpo Monoclonal específico a las moléculas de superficie de linfocitos malignos es un anticuerpo anti-CD20.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el excipiente apropiado es una solución reguladora fisiológica.
- 25 6. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición tiene efecto terapéutico en un rango de dosis del Anticuerpo Monoclonal anti-CD6 de 0.05 a 1 mg/Kg de peso corporal.
- 30 7. Un Anticuerpo Monoclonal anti-CD6 para uso en el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Crónica de Células B, en donde dicho Anticuerpo Monoclonal anti-CD6 es el anticuerpo humanizado T1h del hibridoma secretor de IOR-T1A con No. de depósito ECACC 96112640.

Figura 1

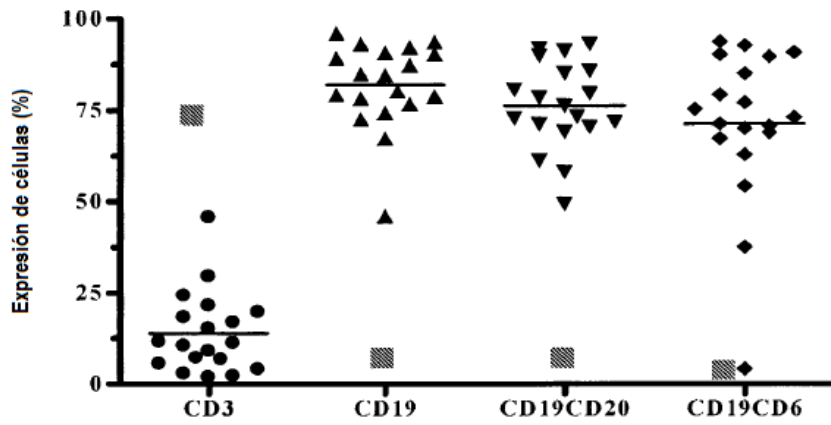


Figura 2

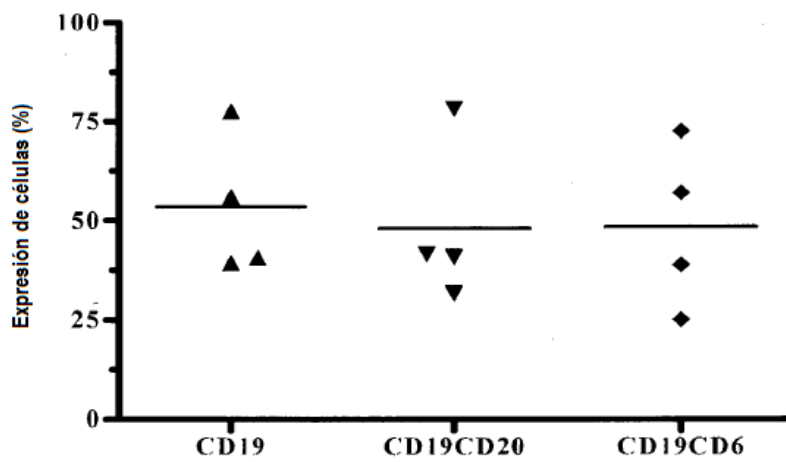
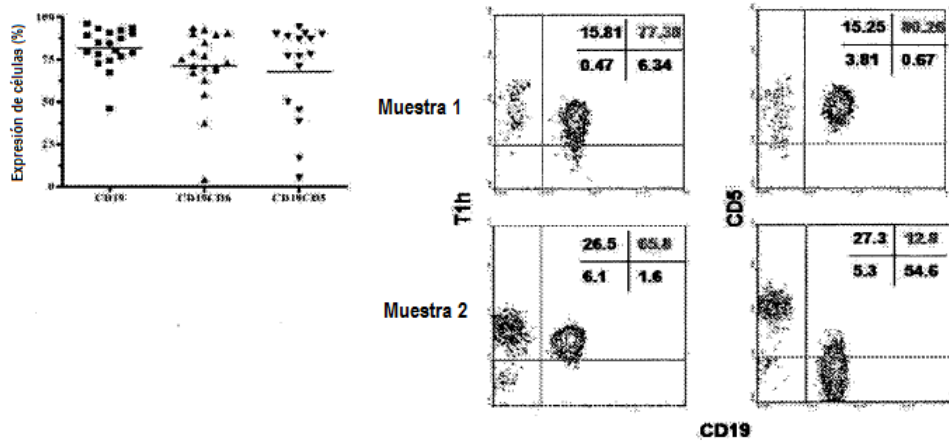


Figura 3

a) Sangre periférica



b) Médula ósea

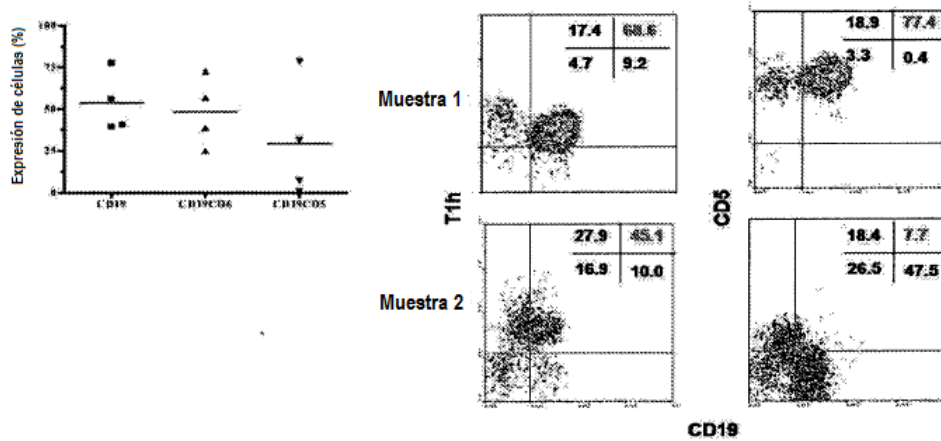


Figura 4

