



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 567**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98907159 .2**
86 Fecha de presentación : **11.03.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0950416**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.1999**

54 Título: **Utilización de TCF-II para el tratamiento de la pérdida de peso corporal, la anemia y la elevación de TNF causadas por el cáncer.**

30 Prioridad: **14.03.1997 JP 9-82162**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **DAIICHI PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**
14-10, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8234, JP

72 Inventor/es: **Kojiro, Masamichi;**
Yano, Hirohisa y
Iemura, Akihiro

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 274 567 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 TCF-II para el tratamiento de la pérdida de peso corporal, la anemia y la elevación de TNF causadas por el cáncer.

Campo técnico

La presente invención se refiere a la utilización del Factor Citotóxico Tumoral II (TCF-II) como agente terapéutico. Se describe en la presente un excelente agente para prevenir y tratar la caquexia causada por uno de los factores seleccionados del grupo que consta de cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades cardíacas, enfermedades infecciosas, choque, quemaduras, endotoxemia, inflamación de órganos, cirugía, diabetes, enfermedades del colágeno, radioterapia, quimioterapia, y es útil para medicina.

Tecnología precedente

De manera general, una enfermedad tal como el cáncer, la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la enfermedad cardíaca, etc., estará acompañada por anorexia, pérdida de peso, agotamiento físico, marasmo, dermatofia, xerosis, anemia, edema, coagulación-fibrinólisis anormal de la sangre, etc., y estas patologías son definidas como caquexia. Después de padecer este marasmo sistémico, el paciente finalmente morirá (Tamaguma, M. y col., Igakuno-ayumi, 149, 371-373 (1989)). Además, si se realiza radioterapia y/o quimioterapia en un paciente con cáncer progresivo o terminal para el que no puede esperarse una operación curativa, puede dar lugar a una función defensiva del organismo biológico, tal como la función inmune, extremadamente disminuida debido a una malnutrición específica que tiene como resultado un acortamiento de la vida. Por tanto, estos son graves problemas en el tratamiento práctico del mismo. Se ha considerado hasta ahora que la causa de la caquexia se inicia por un desequilibrio del equilibrio nutricional entre la entrada nutricional (disminuida) y el gasto nutricional (incrementado) y la influencia de un factor humoral movilizado desde el cáncer o la lesión sobre el metabolismo sistémico. A partir de las situaciones anteriores, se lleva a cabo una alimentación positiva utilizando nutrición parenteral total para suplementar la deficiencia nutricional o energética extrema e incrementar la función inmunológica en el tratamiento de la caquexia. Sin embargo, en la caquexia, la entrada de energía será utilizada no para salvar la vida del paciente sino para la proliferación de las células tumorales, de manera que la alimentación no puede ser un tratamiento suficiente.

Recientemente, se ha prestado atención a monoquinas o citoquinas, tal como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) movilizado a partir de los macrófagos, como causa de la caquexia. Se encontró el TNF como un factor que afectaba a las células tumorales y se elucidó que era secretado por el macrófago, que es uno de los inmunocitos y tiene acción fagocítica. Aunque se esperaba originalmente que fuera un fármaco anticanceroso debido a su efecto citotóxico directo y a su potente actividad antitumoral, se han investigado recientemente varios tipos de acciones del TNF ya que se encontró que producía caquexia, esto es marasmo, incluyendo pérdida de peso de un paciente con cáncer o una enfermedad infecciosa grave o una inflamación inductora de citoquinas líder. Las principales acciones son (1) acción osteoclástica, (2) inducción de hiperlipidemia por inhibición de la captación de lípidos por la célula, (3) inducción de la producción de interleuquina 1 y del factor estimulante de colonias, (4) deterioro de las células angioendoteliales, (5) reacción intermedia de choque por exotoxina en la enfermedad infecciosa grave. Aunque se espera que sea desarrollado un agente para el tratamiento de la caquexia acompañada por cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades cardíacas, enfermedades infecciosas, choque, quemaduras, endotoxemia, inflamación de órganos o de estas mismas enfermedades o de varios tipos de enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide crónica y enfermedad inflamatoria intestinal, de hecho, no hay actualmente ningún agente satisfactorio.

Descripción de la invención

Los presentes inventores investigaron con ahínco para buscar un agente que sirviera para el tratamiento de la caquexia y encontraron que el TCF-II, conocido como factor citotóxico tumoral, tenía un excelente efecto de prevención y tratamiento de la caquexia.

La presente invención se refiere a la utilización de TCF-II en la producción de un agente para la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de peso corporal causada por la proliferación de células cancerosas, de la progresión de la anemia causada por la proliferación de células cancerosas y de la elevación de TNF causada por la proliferación de células cancerosas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de mejora del TCF-II sobre la pérdida de peso en ratones con células KYN-2 trasplantadas del Ejemplo 1. (++) en la figura significa diferencia significativa ($p < 0,01$) entre antes y después de la administración y (**) indica diferencia significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo I después de la administración.

La Figura 2 muestra un efecto de mejora del TCF-II sobre un valor del hematocrito disminuido en ratones con células KYN-3 trasplantadas del Ejemplo 1. (++) en la figura indica diferencia significativa ($p < 0,01$) entre antes y después de la administración.

ES 2 274 567 T3

La Figura 3 muestra el efecto supresor sobre TNF elevado en líquido ascítico de ratones con células KYN-3 trasplantadas del Ejemplo 1. (*) en la figura indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo I y (**) indica diferencia significativa ($p < 0,01$) respecto al grupo I.

5 Modo mejor de realización para la práctica de la presente invención

El TCF-II, que es un ingrediente eficaz de la presente invención, es una proteína conocida derivada de fibroblastos humanos que tiene las características siguientes:

10 1) Peso molecular (mediante electroforesis en SDS)

bajo condiciones no reductoras:

78.000 \pm 2.000 ó 74.000 \pm 2.000

15

bajo condiciones reductoras:

52.000 \pm 2.000 (banda A común)

20

30.000 \pm 2.000 (banda B)

26.000 \pm 2.000 (banda C)

25

2) Punto isoeléctrico: 7,4-8,6

30

El TCF-II anterior puede ser obtenido mediante adsorción de medio de cultivo de fibroblastos humanos sobre una columna de intercambio iónico, purificando posteriormente el eluato mediante cromatografía de afinidad (WO 90/10651) o mediante manipulación por ingeniería genética (WO 92/01053). El TCF-II, que es un ingrediente eficaz de la presente invención, puede ser derivado de fibroblastos o producido mediante manipulación por ingeniería genética utilizando organismos microbianos u otras células sobre la base de la secuencia genética descrita en WO 90/10651. Además, puede utilizarse también el TCF-II obtenido mediante manipulación por ingeniería genética descrito en WO 92/01053. Puede utilizarse también TCF-II con una cadena carbohidratada diferente o sin cadena carbohidratada debido a la diferencia de célula huésped o de organismo microbiano huésped. Sin embargo, puede utilizarse preferiblemente uno con una cadena carbohidratada. El TCF-II obtenido mediante estos métodos puede ser concentrado y purificado mediante un método habitual de aislamiento y purificación. Por ejemplo, pueden ejemplificarse la precipitación con un solvente orgánico, el desplazamiento salino, la permeación en gel, la cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales, la electroforesis. La purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo monoclonal puede ser llevada a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal descrito en una Solicitud de Patente Japonesa dejada abierta no examinada N° 97 (1993). El TCF-II obtenido puede ser liofilizado o mantenido congelado.

35

40

Puede utilizarse como agente de la presente invención una sustancia que tenga la misma actividad que el TCF-II. Por ejemplo, el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF; Solicitud de Patente Japonesa dejada abierta no examinada N° 22526 (1988)) que es formado por la inserción de 5 aminoácidos en la proteína TCF-II, o el Factor de Dispersión purificado (SF; Gherardi y Stocker, Nature, 346, 228 (1990)) pueden ponerse como ejemplo.

45

50

El agente de la presente invención para prevenir y/o tratar la caquexia puede ser administrado intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente. Estas preparaciones farmacéuticas pueden ser preparadas de acuerdo con un método de preparaciones farmacéuticas conocido y, si es necesario, pueden añadirse a las mismas un acondicionador de pH, un tampón y/o un estabilizante. La dosis del presente agente puede ser diferente dependiendo de la gravedad de los síntomas, de las condiciones de salud, de la edad, del peso corporal de un paciente. Aunque la dosis no estará limitada, puede administrarse de una vez o en más veces a una persona adulta una preparación farmacéutica conteniendo 0,6 mg-600 mg de TCF-II/día, preferiblemente 6 mg-60 mg de TCF-II/día.

55

Ejemplo

La presente invención será descrita a continuación con detalle mediante ejemplos ejemplificantes. Sin embargo, éstos son únicamente ejemplos y la presente invención no estará limitada por los mismos.

60

Ejemplo de producción 1

Purificación de TCF-II

65

De acuerdo con un método descrito en WO 90/10651 y con un método de Higashio y col. (Higashio y col., B.B.R.C., vol. 170, pp. 397-404 (1990)), se cultivaron células y se obtuvo TCF-II purificado. Esto es, 3×10^6 fibroblastos humanos, células IMR-90 (ATCC CCL-186) fueron colocadas en una botella rotatoria conteniendo 100 ml de medio DMEM que incluía un 5% de suero de ternera fetal y cultivadas mediante rotación de la misma a una

ES 2 274 567 T3

5 velocidad de 0,5-2 rpm durante 7 días. Cuando el número total de células alcanzó 1×10^7 , las células fueron desprendidas de la pared mediante digestión con tripsina y recogidas en el fondo de la botella. Y 100 g de cerámica con un tamaño de retícula de 5-9 (Toshiba Ceramic) fueron esterilizados y colocados en las mismas, que fueron cultivadas durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron a las mismas 500 ml del medio de cultivo anterior y se continuó el cultivo. El volumen total del medio de cultivo fue recuperado cada 7-10 días y se suplementó medio fresco.

10 La producción fue mantenida de esta manera durante 2 meses y se recuperaron 4 litros de medio de cultivo por botella rotatoria. La actividad específica del TCF-II en el medio de cultivo obtenido según se describió anteriormente fue de $32 \mu\text{g/ml}$. El medio de cultivo (750 l) fue concentrado mediante ultrafiltración utilizando un filtro de membrana (corte de peso molecular 6.000; Amicon) y purificado mediante cromatografía en 4 etapas, esto es, CM-Sephadex C-50 (Pharmacia), Con-A Sefarosa (Pharmacia), columna Mono S (Pharmacia), Heparina-Sefarosa (Pharmacia) para producir TCF-II purificado. Este TCF-II tenía el mismo peso molecular y el mismo punto isoeléctrico que los descritos anteriormente.

15

Ejemplo de producción 2

20 *Producción de TCF-II recombinante*

De acuerdo con el método descrito en WO 92/01053, se cultivaron células transformadas con el gen de TCF-II y se obtuvo TCF-II purificado. Esto es, células Namalwa transformadas fueron cultivadas y se obtuvieron 20 l de medio de cultivo. Este medio de cultivo fue tratado mediante cromatografía en CM-Sephadex C-50, cromatografía en Con-A Sefarosa CL-6B y finalmente mediante HPLC equipada con una columna Mono S para producir 11 mg aproximadamente de TCF-II recombinante.

25

Ejemplo de producción 3

30 *Producción de una preparación farmacéutica de TCF-II*

Se muestra un ejemplo de la producción de inyecciones del TCF-II obtenido en los Ejemplos 1 y 2.

35	(1)	TCF-II	20 μg
		seroalbúmina humana	100 mg

40 La composición anterior fue disuelta en una solución tampón ácido cítrico con pH 6,03 de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

45	(2)	TCF-II	40 μg
		Tween 80	1 mg
		seroalbúmina humana	100 mg

50 La composición anterior fue disuelta en solución salina fisiológica para inyección de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

55	(3)	TCF-II	20 μg
		Tween 80	2 mg
		Sorbitol	4 g

60 La composición anterior fue disuelta en solución tampón ácido cítrico con pH 6,03 de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

65	(4)	TCF-II	40 μg
		Tween 80	1 mg
		Glicina	2 g

ES 2 274 567 T3

La composición anterior fue disuelta en solución salina fisiológica para inyección de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

5	(5)	TCF-II	40 μ g
		Tween 80	1 mg
		Sorbitol	2 g
		Glicina	1 g

10

La composición anterior fue disuelta en solución salina fisiológica para inyección de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

15	(6)	TCF-II	20 μ g
		Sorbitol	4 mg
		seroalbúmina humana	50 mg

20

La composición anterior fue disuelta en una solución tampón ácido cítrico con pH 6,03 de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

25	(7)	TCF-II	40 μ g
		Glicina	2 g
		seroalbúmina humana	50 mg

30

La composición anterior fue disuelta en solución salina fisiológica para inyección de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

35	(8)	TCF-II	40 μ g
		seroalbúmina humana	50 mg

40 La composición anterior fue disuelta en una solución tampón ácido cítrico con pH 6,03 de tal manera que el volumen total fuera de 20 ml. Posteriormente fue dividida en viales que contenían 2 ml cada uno después de la esterilización y que se cerraron herméticamente después de la liofilización.

Ejemplo 1

45 *Efecto de la administración de TCF contra la caquexia en ratones con carcinoma hepatocelular humano trasplantado*

Como carcinoma hepatocelular humano trasplantado, se utilizó la línea celular KYN-2 o la línea celular KYN-3 que mostraron proliferación o dispersión celular en un experimento *in vitro* preliminar. Se produjo un cultivo estático de cada línea celular utilizando medio MEM de Dulbecco (Nissui-seiyaku) conteniendo 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (Gibco), 12 mmoles/l de bicarbonato de sodio, un 20% de suero de ternera inactivado por calor (Whittaker Bioproducts) a 37°C, 5% de CO₂ y un 100% de humedad. Después de añadir tripsina-EDTA a ambas líneas celulares cultivadas, las células fueron separadas, lavadas dos veces con solución de tampón fosfato (PBS) y preparadas para tener una suspensión celular de 2,0 x 10⁷ células/ml.

55 Después de afeitar el pelo de la piel del lugar del trasplante a ratones SCID hembras de 4-5 semanas de edad, de desinfectar el lugar del trasplante con etanol al 70% y de anestesiar con éter, las células tumorales preparadas previamente fueron trasplantadas a los ratones utilizando una aguja de jeringa de 23 G. La línea celular KYN-2 (1,0 x 10⁷) fue trasplantada subcutáneamente en el lomo de los animales y KYN-3 (1,0 x 10⁷) fue trasplantada intraperitonealmente. Tres semanas después del trasplante subcutáneo de la línea celular KYN-2, cuando el diámetro del tumor era de 5 mm, y 5 semanas después del trasplante intraperitoneal de la línea celular KYN-3, estos ratones con el tumor trasplantado fueron divididos en 4 grupos, respectivamente. A los ratones de los grupos I, II, III y IV se les administró vehículo, 0,3 mg de TCF-II/kg/día, 3,0 mg de TCF-II/kg/día y 30 mg de TCF-II/kg/día, respectivamente. Dos veces al día durante 2 semanas, TCF-II fue administrado intraperitonealmente a los ratones con la línea celular KYN-2 trasplantada y fue administrado subcutáneamente a los ratones con la línea celular KYN-3 trasplantada.

65 El peso corporal fue determinado antes y después de la administración en los ratones con la línea celular KYN-2 trasplantada subcutáneamente. El hematocrito fue medido antes y después de la administración de TCF-II mediante

ES 2 274 567 T3

la toma de una muestra de sangre con un capilar heparinizado para hematocrito (Termo) de la arteria del fundus ocular bajo anestesia etérea en los ratones con KYN-3 y la centrifugación de la misma mediante el método habitual. Posteriormente, se midió el nivel de TNF en el líquido ascítico utilizando el kit de ELISA “Factor-Test-XTM-Mouse TNF ELISA Kit” (Genzyme) después de la administración de TCF y se realizó la autopsia bajo anestesia etérea. En la absorciometría se utilizó Easy Reader EAR 400 (SLT Laboinstruments).

El cambio del peso corporal en el grupo al que se administró el vehículo y en los grupos a los que se administró TCF-II está mostrado en la Figura 1. En el grupo al que se administró vehículo (grupo I), el peso corporal se redujo significativamente (20% de pérdida aproximadamente) durante 2 semanas. Por otra parte, la pérdida de peso corporal fue suprimida de manera dependiente de la dosis en los grupos a los que se administró TCF-II. Especialmente en el grupo IV, no había diferencia significativa antes y después de la administración y, además, el peso corporal del grupo IV era claramente mayor que el del grupo I después de la administración. El cambio del hematocrito en el grupo al que se administró el vehículo y en los grupos a los que se administró TCF-II está mostrado en la Figura 2. Tras la administración de TCF-II, se mejoró el hematocrito en los ratones con cáncer y la progresión de la anemia que acompañaba a la proliferación tumoral tendía a ser suprimida. Además, el efecto supresor del TCF-II sobre la elevación de TNF está mostrado en la Figura 3. El TNF, que es una causa de la caquexia en los animales con cáncer, fue disminuido significativamente de manera dependiente de la dosis por la administración de TCF-II y se observó una supresión significativa incluso en el grupo II al que se había administrado la dosis mínima de 0,3 mg/kg/día. Esto es, la administración de TCF-II mejoró significativamente la caquexia tal como la pérdida de peso corporal causada por la proliferación del cáncer, la progresión de la anemia y la elevación del TNF.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de TCF-II en la producción de un agente para la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de peso corporal causada por la proliferación de células cancerosas, de la progresión de la anemia causada por la proliferación de células cancerosas y de la elevación del TNF causada por la proliferación de células cancerosas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

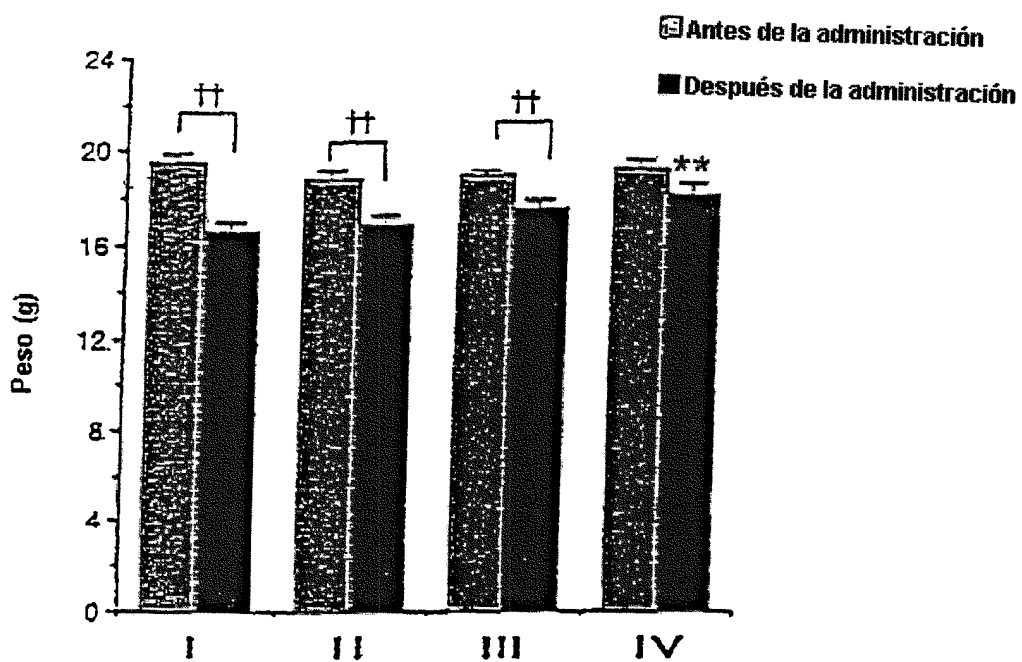


Fig. 2

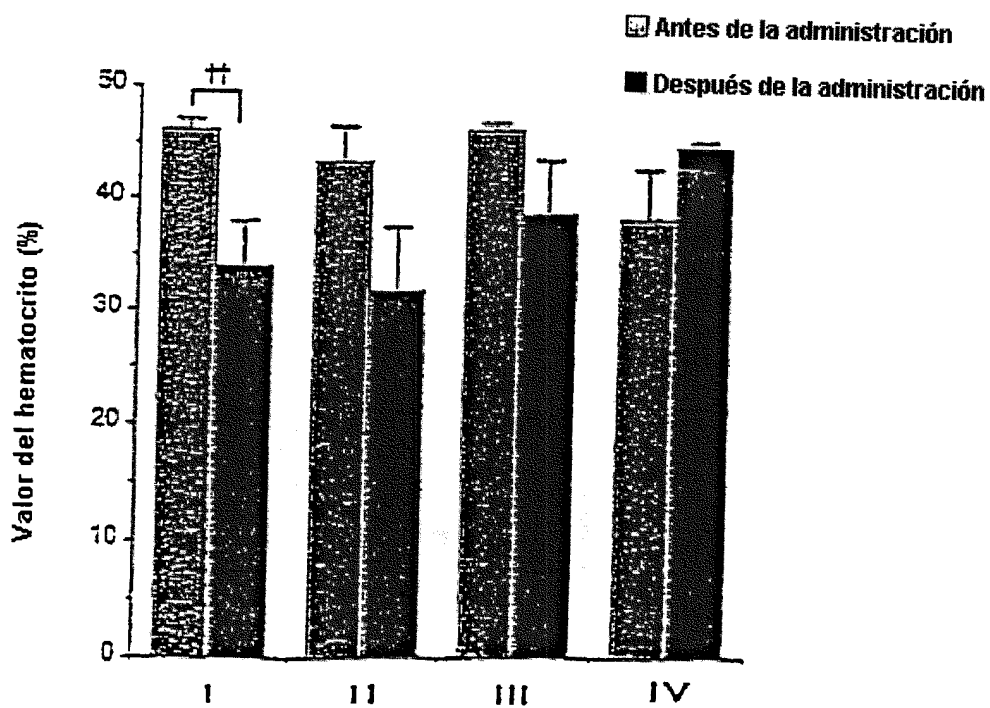


Fig. 3

