



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 300**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98904563 .8**
86 Fecha de presentación : **15.01.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1007082**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2000**

54 Título: **Factor de necrosis tumoral modificado.**

30 Prioridad: **15.01.1997 US 35521 P**
14.01.1998 US 6810

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es: **Phoenix Pharmacologics, Inc.**
115 John Robert Thomas Drive
Exton, Pennsylvania 19341, US

72 Inventor/es: **Clark, Mike, A.**

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 275 300 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

Factor de necrosis tumoral modificado.

5 Esta invención se refiere, entre otros, al factor de necrosis tumoral modificado con un polietilenglicol que tiene un peso molecular en el rango de 20.000 a 40.000 y a la utilización de una cantidad terapéuticamente efectiva del TNF modificado en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores.

10 El melanoma maligno (etapa 3) es una enfermedad mortal que mata a la mayoría de los pacientes en un año a partir de su diagnóstico. La incidencia del melanoma está aumentando rápidamente en Estados Unidos y aún más en otros países como Australia. Se necesitan urgentemente tratamientos eficaces para los pacientes que padecen melanomas.

15 Actualmente el cáncer del riñón mata cada año a aproximadamente 13.000 individuos en Estados Unidos. Con frecuencia esta forma de cáncer no se detecta hasta que no está ya muy avanzada. La única forma de tratamiento, que afecta notablemente a la prognosis del paciente, es la resección quirúrgica del órgano afectado. Desafortunadamente, debido a que este tipo de cáncer es muy metastático, la eliminación total de todas las metástasis es difícil, si no imposible.

20 El cáncer de colon es una de las formas más frecuentes de cáncer y, en la actualidad, mata cada año a aproximadamente 140.000 individuos en Estados Unidos. Aunque se ha desarrollado una gran cantidad de medicamentos quimioterapéuticos tradicionales para tratar esta enfermedad, la supervivencia a largo plazo (definida como porcentaje de pacientes que sobreviven en los cinco años siguientes o más) no ha cambiado de forma notable en las últimas cuatro décadas. Además, todos los medicamentos quimioterapéuticos tradicionales desarrollados son muy tóxicos, tienen efectos secundarios nocivos y, a menudo, mortales y son caros. Se necesita urgentemente un tratamiento curativo no tóxico para esta enfermedad.

25 El sello característico de los melanomas, tumores renales y de colon es que estos tumores desarrollan rápidamente una resistencia a la quimioterapia tradicional. A pesar de que los pacientes puedan responder inicialmente al tratamiento quimioterapéutico, rápidamente se desarrollan tumores resistentes a los medicamentos y finalmente matan al paciente. Una alternativa para tratar estos tumores consistiría en identificar un "talón de Aquiles" en los tumores y desarrollar terapias que trataran selectivamente este blanco. Se ha identificado ya uno de estos blancos potenciales. En particular, se ha observado que tres de estos tipos de tumores requieren la amplia vascularización de cada una de las metástasis para que el cáncer crezca. Por tanto, se podría predecir que un agente terapéutico que inhibiera la vascularización de estos tumores proporcionaría un único medio de tratamiento para éstos.

30 El factor de necrosis tumoral (TNF) es una de las numerosas citoquinas, un grupo de diversas proteínas producidas por leucocitos y células asociadas con actividad inmunoestimulante. El TNF originalmente fue identificado por su capacidad de provocar necrosis en los tumores. Existen al menos dos mecanismos distintos por los cuales se piensa que el TNF mata los tumores. El primero es mediante un efecto directo sobre el tumor mismo. Como alternativa, el TNF puede alterar la vascularización de los tumores. En un primer escrito que describe el TNF, Carswell y Old mostraron que las células tumorales MET A eran totalmente resistentes al TNF *in vitro* (*J. Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 72:3666-3670 (1975)). Sin embargo, los tumores MET A en ratones eran extremadamente sensibles al TNF *in vivo*. Se pensó que se debía al hecho de que el TNF alteraba selectivamente la vascularización de estos tumores. Más tarde se demostró que diversos tumores liberaban algún factor aún no identificado haciendo que las células endoteliales vasculares normales adyacentes a los mismos fueran sensibles a la muerte por TNF. En resumen, el TNF mata estos tumores no atacando directamente las células tumorales, sino más bien a las células endoteliales vasculares normales que recubren los vasos sanguíneos que proporcionan al tumor sangre, oxígeno y demás nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento.

35 Desafortunadamente, los primeros ensayos clínicos trataron de desarrollar el TNF como agente tumoricida directo. Cuando se utilizaron de esta forma, era necesario inyectar grandes dosis de TNF, ya que abandonaban rápidamente (en menos de 20 minutos) la circulación sanguínea. Además, estas altas dosis de TNF inducían síntomas de tipo "shock" caracterizados por una rápida caída de la presión sanguínea. Una forma alternativa de utilizar el TNF consistiría en formularlo para que permanezca en la circulación sanguínea. Al hacerlo, el TNF tendría más tiempo para interactuar con la vasculatura tumoral y tendría tiempo suficiente para alterar el suministro de sangre al tumor.

40 Se han formulado diversas otras proteínas terapéuticas con polietilenglicol (PEG) para que circulen más tiempo y permanezcan en la vasculatura. Estas proteínas incluyen asparaginasa, adenosin-desaminasa y súper óxido-dismutasa (véase por ejemplo, Harras, J.M., "Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biochemical Applications", Plenum Press (1992)). Anteriormente un grupo de investigadores japoneses habían descrito que se podía formular el TNF con un cierto PEG y que el material resultante tenía una vida media en la circulación sustancialmente incrementada y una mayor actividad antitumoral (Tsutsumi, Y. y col., *Jap. J. Cancer Res.*, 85:9-12 (1994); Tsutsumi, Y. y col., *Jap. J. Cancer Res.*, 85:1185-1188 (1994); Tsutsumi, Y. y col., *Jap. J. Cancer Res.*, 87:1078-1085 (1997)). Estos investigadores utilizaron sólo un PEG de peso molecular 5.000 acoplado a las aminas primarias del TNF con un enlace succinidimil succinato.

45 Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que la modificación del TNF con un polietilenglicol (PEG) de un peso molecular promedio en peso aproximadamente dentro del rango de 20.000 a 40.000, preferentemente en el rango

ES 2 275 300 T3

de 20.000 a 30.000, incrementa notablemente la vida media en circulación del TNF y también mejora la actividad tumoricida del TNF. Por ejemplo, se ha incrementado la vida media en suero del TNF mediante esta modificación, desde un tiempo tan corto como de 20 minutos hasta quince días, y se ha reducido la ED50 antitumoral desde una cantidad tan alta como de 1.000-3.000 IU hasta una tan pequeña como de 10-50 IU. Como resultado de la modificación, se pueden administrar dosis más bajas de TNF para tratar eficazmente los tumores con pocos efectos secundarios negativos asociados para el paciente.

Por tanto, esta invención se refiere a un TNF modificado caracterizado porque dicha modificación comprende la unión covalente al TNF, bien directamente o a través de un agente de enlace biocompatible, de una o más moléculas de PEG con un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000. El TNF es modificado por cinco a doce de las moléculas de PEG, preferentemente por cinco a nueve moléculas de PEG aproximadamente.

Esta invención se refiere también a la utilización de una cantidad terapéuticamente efectiva del TNF modificado para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un paciente que padece de un tumor.

Esta invención se refiere además a un método para aumentar la vida media en circulación del TNF, el cual comprende la modificación de dicho TNF mediante la unión covalente al mismo de entre aproximadamente cinco y doce moléculas de un PEG con un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000.

Esta invención se refiere además a un método para aumentar la actividad tumoricida del TNF que comprende la modificación de dicho TNF mediante la unión covalente al mismo de entre aproximadamente cinco y doce moléculas de un PEG con un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000.

La Figura 1 es un gráfico que describe la vida media en circulación en suero de ratón del TNF- α nativo (círculos abiertos), SS 5.000 MW PEG-TNF- α (círculos cerrados) y 20.000 MW PEG-TNF- α (triángulos abiertos).

La Figura 2 es un gráfico que describe la vida media en circulación en suero de ratón del TNF- α nativo (círculos abiertos), SS 5.000 MW PEG-TNF- α (círculos cerrados), SS 12.000 MW PEG-TNF- α (triángulos cerrados), SS-20.000 MW PEG-TNF- α (triángulos abiertos), NHS 12.000 MW PEG-TNF- α (cuadrados cerrados) y NHS 20.000 MW PEG-TNF- α (cuadrados abiertos).

El "factor de necrosis tumoral o TNF" tal como se utiliza aquí abarca la proteína naturalmente derivada, tal como proteínas aisladas de TNF humano o de ratón, o la proteína producida mediante tecnología recombinante, tal como el TNF recombinante murino y el TNF recombinante humano. Aunque es preferente la proteína TNF- α , el término "TNF" abarca también la proteína TNF- β . Los términos abarcan también aquellas proteínas del TNF que han sido mutadas por delección o alteración de los aminoácidos sin perjudicar notablemente su actividad biológica (a modo ilustrativo, como ejemplos no limitativos, eliminar los aminoácidos 212-220 o cambiar la lisina en 248, 592, 508 por alanina).

"Polietilenglicol o PEG" se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena ramificada o lineal representada por la fórmula general $H(OCH_2CH_2)_nOH$. Se utiliza "polietilenglicol o PEG" junto con un sufijo numérico para indicar el peso molecular promedio en peso aproximado del mismo. Por ejemplo, PEG 5.000 se refiere a un polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio en peso aproximado de aproximadamente 5.000; PEG 12.000 se refiere a un polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio en peso aproximado de aproximadamente 12.000 y PEG 20.000 se refiere a un polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio en peso aproximado de aproximadamente 20.000. Estos polietilenglicoles están disponibles de varias fuentes comerciales y se habitualmente se les denomina tal como se ha indicado anteriormente, con su peso molecular promedio en peso.

Un "melanoma" puede ser un tumor benigno o maligno que procede del sistema melanocítico de la piel y demás órganos, incluida la cavidad bucal, el esófago, el canal anal, la vagina, las leptomeninges y/o la conjuntiva o el ojo. El término "melanoma" incluye, por ejemplo, melanoma acral lentiginoso, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma léntigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de extensión superficial.

Como "paciente" se entiende un animal, preferentemente un mamífero, en particular un ser humano.

"Biocompatible" se refiere a materiales o compuestos que generalmente no son perjudiciales para las funciones biológicas y que no provocarán en grado alguno una toxicidad no aceptable, incluyendo los estados alérgicos y de enfermedad.

Por "vida media en circulación" se entiende el período de tiempo posterior a la inyección del TNF modificado a un paciente durante el cual no se ha eliminado una cantidad de TNF a un nivel de la mitad del nivel máximo original en suero. La vida media en circulación puede ser determinada en cualquier especie relevante, incluidos los humanos o ratones.

"Unido covalentemente" tal como se utiliza aquí se refiere a una unión covalente que enlaza la proteína del TNF a la molécula de PEG, bien sea directamente o a través de un agente enlazante.

ES 2 275 300 T3

De acuerdo con esta invención, el TNF se modifica con un polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000, preferentemente en el rango de 20.000 a 30.000. En general, un polietilenglicol con un peso molecular de 30.000 o mayor es difícil de disolver, lo que reduce mucho los rendimientos del producto formulado. El polietilenglicol puede ser de cadena ramificada o lineal, pero preferentemente es una
5 cadena lineal.

Los polietilenglicoles pueden estar unidos al TNF a través de grupos enlazantes biocompatibles. Tal como se ha expuesto anteriormente, "biocompatible" indica que el compuesto o el grupo no es tóxico y puede ser utilizado *in vitro* o *in vivo* sin causar daño, náuseas, enfermedad o muerte. El PEG puede unirse al grupo enlazante, por ejemplo, a través de un enlace éter, de un enlace éster, de un enlace tiol o de un enlace amida. Los grupos enlazantes biocompatibles incluyen, por ejemplo, los grupos éster, amida, imida, carbamato, carboxilo, hidroxilo, carbohidrato, maleimida (incluidos, por ejemplo, succinidimil succinato (SS), succinidimil propionato (SPA), succinidimil carboximetilato (SCM), succinidimil succinamida (SSA) o N-hidroxisuccinimida (NHS)), epóxido, oxicarbonilimidazol (incluyendo, por ejemplo, nitrofenil carbonato (NPC) o triclorofenil carbonato (TPC)), trisilato, aldehído, isocianato, vinilsulfona, tirosina, cisteína, histidina o una amina primaria. Preferentemente, el grupo enlazante biocompatible es un grupo éster y/o un grupo maleimida y las uniones al TNF a través de una amina primaria sobre la proteína del TNF. En especial, el grupo enlazante es SS, SPA, SCM, SSA o NHS, siendo el más preferente el SS.
10
15

Como alternativa, el TNF puede estar acoplado directamente al PEG (es decir, sin un grupo enlazante) a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo.
20

Los métodos para unir covalentemente el TNF al PEG, directamente o a través de un grupo enlazante biocompatible, son conocidos en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en Harras, J.M., "Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biochemical Applications", Plenum Press (1992), cuyo descubrimiento se incorpora aquí como referencia. Se prefiere que la proteína del TNF esté unida covalentemente a cinco hasta doce moléculas de PEG. En la técnica ya se conoce métodos para determinar el número de moléculas de PEG unidas a la proteína, por ejemplo Habeeb, A.F.S.A., *Anal. Biochem.*, 14:328-339 (1966); Harras, J.M., *supra.*, incorporados aquí como referencia. El número de moléculas de PEG unidas al TNF variará según el grupo enlazante utilizado, la duración de la reacción y las proporciones molares de TNF y PEG utilizadas en la reacción.
25
30

Como será evidente para un especialista en la materia, el TNF modificado de esta invención puede administrarse de diversas formas, por ejemplo vía oral, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intralinfática, intratumoral, intramuscular, intersticial, intraarterial, subcutánea, intraocular, intrasinovial, transepitelial y transdérmica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de uno de los compuestos modificados de la presente invención es aquella cantidad eficaz que inhibe el crecimiento tumoral y puede variar según el método de administración. En general, las dosis eficaces oscilan entre aproximadamente 0,001 y 0,1 mg/kg una vez a la semana. El TNF modificado puede formularse con vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables, tal como es conocido en la técnica. Por ejemplo, para la administración intravenosa, el TNF modificado puede mezclarse con una solución salina tamponada con fosfato, o con cualquier otra solución adecuada conocida por el especialista en la materia, antes de su inyección. Las pruebas demostraron que el TNF modificado es particularmente eficaz para tratar melanomas, tumores de cáncer de colon, de
35
40
45
cáncer renal y de cáncer de mama.

Se demuestra además la invención en los ejemplos siguientes, cuyo objetivo es ilustrativo y que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.
45

El TNF utilizado en los experimentos descritos a continuación era de origen humano y de ratón. Se obtuvo el TNF humano (proteína total) de *E. coli* y el TNF murino así como los mutantes de TNF humano de *Pichea pastoris*. El TNF recombinante se obtuvo de *E. coli* o *Pichea* utilizando métodos similares a los descritos en Pennica, D. y col., *Nature*, **312**:724-729 (1981); Streekishna, K. y col., *Biochemistry*, **28**:4117-4125 (1989). El TNF de ratón se obtuvo de *E. coli* y *Pichea*.
50

Ejemplo 1

Actividad Específica del TNF- α

55

Antes de la modificación con PEG, se sometió a ensayo el factor de necrosis de un tejido maduro (TNF- α) (recombinante humano) mediante un ensayo de citotoxicidad L929 tal como se describe a continuación. La actividad específica del TNF- α era de 10⁶ I.U. unidades por miligramo. La densitometría de un gel SDS-PAGE mostró que el material era puro al 99%.
60

Se concentró el material (1 ml a 16,8 mg/ml, determinado por el método de Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, **72**:248-254 (1976), con un patrón de seroalbúmina bovina (BSA), modificación de Peterson) hasta aproximadamente 0,1 ml utilizando un Centricon de corte de 3.000 kDa. A continuación se diluyó este material a 4 ml con tampón de fosfato 100 mM, a un pH 8,0, y se volvió a concentrar hasta 0,1 ml. Se repitió dos veces este procedimiento y el material resultante se recogió finalmente en un volumen total de 1 ml del mismo tampón.
65

Se determinó entonces la concentración de proteínas mediante el método de Bradford mencionado anteriormente. Se utilizó como patrón BSA y se recuperaron aproximadamente 0,6 mg de proteína.

ES 2 275 300 T3

Modificación con PEG (PEGuilación)

Se llevaron a cabo reacciones de PEGuilación mediante los métodos generales descritos en Harras, J.M., mencionados anteriormente. Se añadió al TNF (1 mg/ml en tampón fosfato 100 mM, a un pH 7,2-7,5) SS-PEG o NHS-PEG con un exceso molar de 10 a 50 y se mezcló durante una hora a temperatura ambiente. El pH específico y la relación molar utilizados variaron con la reactividad del PEG y tuvieron que determinarse empíricamente. Se separó el PEG-TNF del PEG y el TNF no reaccionados por ultrafiltración con un filtro de separación de 100 kDa. En cada una de las modificaciones mencionadas en este ejemplo, el TNF fue modificado por cinco a nueve moléculas de PEG.

Se evaluó la pureza del PEG-TNF mediante SDS-PAGE y se determinó el porcentaje de aminas primarias modificadas por este procedimiento mediante fluorescamina como lo describe S.J. Stocks (Anal. Biochem. **154**:232 (1986)). Los resultados SDS-PAGE indicaban que muy poco TNF- α nativo, si es que lo había, quedaba en la preparación después de la PEGuilación.

15 *Actividad in vitro del PEG-TNF- α*

Se examinó el PEG-TNF- α para determinar la actividad citotóxica *in vitro* utilizando el ensayo de citotoxicidad L-929 realizado de acuerdo con el procedimiento establecido a continuación, salvo que no se conocía el número de pasadas de las células. La actividad específica de la materia prima TNF- α era de $1,5 \times 10^6$ unidades/mg o aproximadamente la mitad de la medida de la actividad específica original. Las diferencias en la actividad específica se atribuyeron a la utilización de un método distinto de determinación proteínica y al número desconocido de pasadas de las células.

La actividad específica de SS 5.000 MW PEG-TNF- α era de $0,7 \times 10^6$ unidades/mg, o de aproximadamente la mitad de la actividad específica del material nativo. La actividad específica de SS-20.000 MW PEG-TNF- α era de $0,8 \times 10^6$ unidades/mg, un valor similar al de SS 5.000 MW PEG-TNF- α .

Letalidad del PEG-TNF- α

Como prueba, se inyectó TNF- α nativo o SS-PEG-TNF- α vía intraperitoneal (i.p.) a dos ratones C57/BL6 (hembras, 20-25 g) y se controló la supervivencia de los animales. Las dosis utilizadas fueron de 1, 5, y 10 miles de unidades de actividad.

Con el TNF- α nativo se obtuvieron los resultados siguientes:

35	10.000 I.U.	ambos ratones murieron a la mañana siguiente.
	5.000 I.U.	un ratón murió a la mañana siguiente; el segundo, obviamente sufriendo mucho (pelo desordenado y poco movimiento), murió dos días después.
40	1.000 I.U.	un ratón murió a la mañana siguiente; el segundo, sufriendo (pelo desordenado y poco movimiento) y en tal estado de debilidad, después de 2 días fue sacrificado.

Con el SS-PEG-TNF- α , todos los ratones a todas las dosis se mantuvieron con buena salud durante dos semanas después de la inyección. El comportamiento era normal, como lo eran su alimentación y bebida. No hubo cambio en su pelaje (el pelo no estaba desordenado). Se sacrificaron todos los ratones 15 días después de la inyección.

Determinación de la vida media en suero del PEG-TNF- α

Se utilizó un ensayo ELISA para el TNF humano obtenido de Genzyme. Se utilizó el kit tal como lo sugería el fabricante. Se inyectó i.p. a los ratones TNF- α o PEG- α (100 unidades) y se recogieron aproximadamente 25 μ l de suero de sangrados retroorbitales en los tiempos indicados en la Fig. 1. Cada grupo contenía un total de 5 ratones (hembras, ratones C57/BL6, 20-25 g).

El TNF- α nativo (círculos abiertos) se eliminó muy rápidamente y el único punto de datos encima de la línea base fue a los 30 minutos tras la inyección.

El SS 5.000 MW PEG-TNF- α (círculos cerrados) tenía una vida media de aproximadamente 4 días. La vida media de 20.000 MW PEG-TNF- α (triángulos abiertos) fue > 15 días.

Se repitió este experimento utilizando los grupos de tratamiento relacionados a continuación, los resultados se presentan en la Fig. 2: TNF- α nativo (círculos abiertos); SS 5.000 MW PEG-TNF- α (triángulos cerrados); SS 20.000 MW PEG-TNF- α (triángulos abiertos); NHS 12.000 MW PEG-TNF- α (cuadrados cerrados). La vida media en suero para los distintos grupos de tratamiento fue > 15 días para NHS 20.000 MW PEG-TNF- α y SS 20.000 MW PEG-TNF- α ; aproximadamente de 4 días para SS 5.000 MW PEG-TNF- α ; aproximadamente de 6 días para SS 12.000 MW PEG-TNF- α ; aproximadamente de 8 días para NHS 12.000 MW PEG-TNF- α ; y de 30 minutos después de la inyección para el TNF- α nativo. En resumen, cada PEG-TNF- α mostraba una vida media mucho mayor que el TNF- α nativo; sin embargo, el NHS 20.000 MW PEG-TNF- α y el SS 20.000 MW PEG-TNF- α tenían unas vidas medias notablemente más largas (> 15 días) que el TNF- α modificado con un PEG de peso molecular más bajo.

ES 2 275 300 T3

Actividad antitumoral del PEG-TNF- α

Se utilizó el modelo de melanoma BL6. A ratones C57 BL6 (hembras, 20-25 g) les fueron inyectadas un millón de células BL6 s.q. en el costado. Se dejaron crecer los tumores durante una semana antes de empezar el tratamiento. Cada grupo de tratamiento se componía de 5 ratones.

Los grupos de tratamiento incluían: un control tampón fosfato (pH 7,5), TNF- α nativo (10 I.U. y 100 I.U.) en tampón fosfato (pH 7,5) y SS-PEG-TNF- α (10 I.U., 100 I.U. y 1000 I.U.) en tampón fosfato (pH 7,5). Se inyectó a los ratones 0,1 ml i.p. una vez a la semana el Día 7, Día 14 y el Día 21. Se registró la supervivencia de los animales.

Después de la Semana 2 (una semana después del primer tratamiento), los tumores en los animales de control eran bastante visibles. Parece que ninguno de los animales tratados con SS-PEG-TNF- α tenía tumores en crecimiento.

Al Día 22, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 1:

TABLA 1

Grupo de Tratamiento	Resultados
Control	4 muertos, 1 con tumor grande
TNF-α Nativo	
10 I.U.	todos los animales muertos
100 I.U.	4 muertos, 1 con tumor grande
5000 MW SS-PEG-TNF-α	
10 I.U.	2 muertos, 3 con tumores grandes
100 I.U.	2 muertos, 2 con tumores, 1 sin tumor
1000 I.U.	1 muerto, 3 con tumores pequeños, 1 sin tumor
20.000 MW SS-PEG-TNF-α	
10 I.U.	0 muertos, 1 con tumor pequeño, 4 sin tumor
100 I.U.	todos los animales sin tumor
1000 I.U.	todos los animales sin tumor

Al Día 180, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 2:

TABLA 2

Grupo de Tratamiento	Tiempo de Supervivencia	Resultados
Control	18, 18, 20, 21, 24 días	20,2 días
TNF-α Nativo		
10 I.U.	17, 18, 19, 21, 21 días	20,2 días
100 I.U.	16, 18, 19, 19, 23 días	19,0 días
5000 MW SS-PEG-TNF-α		
10 I.U.	20, 22, 24, 26, 27 días	23,6 días
100 I.U.	21, 22, 24, 26, 27 días	35,0 días
1000 I.U.	21, 49, 53 días; 2 animales vivos	

ES 2 275 300 T3

Grupo de Tratamiento	Tiempo de Supervivencia	Resultados
20000 MW SS-PEG-TNF-α		
10 I.U.	38 días, 4 animales vivos	
100 I.U.	todos los animales vivos	
1000 I.U.	todos los animales vivos	

Estos resultados indican que la modificación del TNF con PEG no sólo reduce la letalidad del TNF sino que el TNF modificado con un PEG de un peso molecular de aproximadamente 20.000 sorprendentemente muestra una mayor vida media en circulación y, sorprendentemente, una actividad antitumoral notablemente mayor.

Estos resultados son sorprendentes por diversas razones. No había forma de predecir que la modificación del TNF con un PEG de alto peso molecular incrementaría la media vida en circulación del TNF. Realmente, la velocidad de eliminación de proteínas en general no puede ser prevista basándose en su peso molecular. Esta modificación del TNF con un PEG de alto peso molecular, que no sólo no disminuye sino que en realidad aumenta la actividad tumoricida del TNF, es sorprendente en lo que respecta al impedimento estérico añadido que se espera se cree por el modificador de alto peso molecular. Aún más, se podría haber previsto que el TNF modificado, debido a su mayor vida media en circulación, podría haber sido aún más tóxico que el TNF nativo, lo que no fue el caso.

A continuación se describe el ensayo de citotoxicidad utilizado en este ejemplo.

A. Materiales

Fibroblastos L929 ATCC #CCL-1 NCTC clon 929

Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM)

Suero Bovino Fetal (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY #16000-010)

Tampón HEPES 1M en Salino Normal (BioWhittaker, Inc. #17-737E)

Sulfato de Gentamicina (BioWhittaker, Inc., #17-518Z)

Tripsina-EDTA 1X (GIBCO Laboratories, #25300-021)

Colorante Azul de Tripsina (GIBCO Laboratories, #15250-012)

Matraces de cultivo tisular, 150 cm², 75 cm², 25 cm² (Corning, Inc., Corning, NY, #25120, #25110, #25100).

Placas de cultivo celular de 96 pocillos, fondo plano (Corning Inc., #25861)

Pipeteador de 12 canales (Titertek)

Boquillas estériles para pipeta (Intermountain Scientific Corp., Bountiful, UT. #P-3250-8)

Recipientes estériles para reactivos (Costar Corp., Cambridge, MA, #4870)

Factor- α de Necrosis Tumoral (TNF- α) Humano Recombinante (preparado *in situ*)

Albúmina, bovina, 10% en IMEM (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, #652237)

Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS)

Solución Salina Tamponada con Fosfato Dulbecco (D PBS) (GIBCO Laboratories, #310-4190)

Lector de Placas Microtituladas (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, Emax)

B. Propagación de fibroblastos L929

1. Mantener los fibroblastos pasándolos dos veces en semana por DMEM/10% FBS como sigue. Aspirar el medio del matraz dejando las células adherentes. Lavar la monocapa celular con 5 ml de tripsina-EDTA y aspirar la tripsina-EDTA. Incubar de 1 a 2 minutos a 37°C. Añadir 15 ml de DMEM/FBS para eliminar por lavado la monocapa e interrumpir la actividad enzimática de la tripsina.

ES 2 275 300 T3

2. Contar las células y evaluar la viabilidad mediante exclusión de Azul Trypan. Inocular 30 ml de DMEM/FMS sin antibióticos en un matraz T75 con 1×10^6 células. Incubar en una incubadora humidificada con un 5% de CO_2 , a 37°C .

5 3. Para el ensayo, inocular 60 ml de DMEM/FBS en un Matraz T150 con 2×10^6 células. Incubar el matraz durante 3 ó 4 días hasta que las células se aproximen a la confluencia (80-90%).

C. Ensayo de citotoxicidad de TNF- α *in vitro*

10 Día Uno

Preparación de las células

15 1. Tripsinizar las células y diluirlas con DMEM/FBS hasta una concentración final de $1,22 \times 10^6$ células/ml. Añadir sulfato de gentamicina hasta una concentración final de $50 \mu\text{g/ml}$. Se requiere un recuento celular de 2×10^6 células para cada placa y se pueden esperar $1,75-2 \times 10^7$ células procedentes del matraz T150.

20 2. Disponer en placas los L929 fibroblastos mediante la adición de $150 \mu\text{l}$ de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano. Incubar durante toda la noche en una incubadora humidificada con un 5% de CO_2 , a 37°C .

Día Dos

Adición de las muestras

25 1. Mediante un microscopio invertido, comprobar la confluencia de cada pocillo antes de proseguir. Cada pocillo debe ser confluyente equivalentemente para que el ensayo sea reproducible. No se utilizan los pocillos exteriores de la placa para los cálculos del ensayo debido al crecimiento irregular de las células en éstos. Las células deben ser confluentes del 75 al 90% para una mejor sensibilidad. Al aumentar el número de pasadas de las células disminuyen
30 las horas para la duplicación de las células. El número de células/pocillo puede ajustarse en consecuencia para obtener la confluencia correcta.

2. Preparar la solución de trabajo estándar de TNF- α . Mantener a 4°C hasta su utilización.

35 3. Añadir $150 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo de TNF en el primer pocillo de las columnas 2 y 3. Añadir $150 \mu\text{l}$ de muestra en el primer pocillo de las columnas 4 hasta 10. Añadir DMEM/FBS/gentamicina en las columnas 1, 11 y 12. Realizar dobles diluciones en serie mezclando el contenido de los primeros pocillos y trasladando $150 \mu\text{l}$ a los segundos pocillos de las columnas con un pipeteador de 12 canales. Finalmente, mezclar el contenido de los pocillos 8 (fila H) y descartar $150 \mu\text{l}$ de cada uno. En este punto, todos los pocillos deben contener $150 \mu\text{l}$.

40 4. Incubar las placas durante 20 horas en una incubadora humidificada con un 5% de CO_2 , a 37°C .

Día Tres

45 Se determinó la viabilidad de las células mediante la adición de $20 \mu\text{l}$ de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (25 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4) en cada pocillo de la placa de cultivo y la incubación de los cultivos a 37°C durante cuatro horas. Pasado este tiempo, se descartaron los sobrenadantes de cultivo y se añadieron $150 \mu\text{l}$ de DMSO en cada pocillo. Se determinó la absorbancia de cada pocillo a 570 nm mediante un lector de placas microtituladas. Se considera que los pocillos que muestran un A_{540} más cercano al 50%
50 de la media aritmética control representan el 50% de lisis (1 unidad) de las células L929.

D. Soluciones

TNF- α Estándar (10 μg)

55 Descongelar el TNF- α estándar congelado en hielo. Partes alícuotas en criotubos de tapa roscada a $2 \mu\text{g/tubo}$ y almacenar a -80°C .

Solución de Reserva Estándar de TNF- α (256 ng/ml)

60 En un tubo ($2 \mu\text{g}$) de TNF- α estándar, añadir $7,81 \text{ ml}$ de albúmina 1% en D-PBS/gentamicina. Partes alícuotas en tubos de 1 ml y mantener a 4°C . Normalmente la solución se puede emplear durante seis meses.

Solución de Trabajo de TNF- α (0,8 ng/ml)

65 Para dos placas, añadir $3,12 \mu\text{l}$ de solución de reserva a $997 \mu\text{l}$ de DMEM/FBS/gentamicina (la solución estándar será diluida a 1:2 en el primer pocillo de la placa multipozo a una concentración final de $0,4 \text{ ng/ml}$). Mantener a 4°C hasta su utilización.

ES 2 275 300 T3

1 l de salino tamponado con fosfato (PBS, 1%)

Disolver 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl, y 1,14 g de Na₂HPO₄ en 900 ml de agua. Ajustar el pH a 7,4 Q.S. a 1l. Tratar en autoclave.

Ejemplo 2

Se prepararon muestras adicionales de TNF humano recombinante modificado con PEG (de acuerdo con los métodos generales descritos en Harras, *Supra.*) y se sometieron a prueba para determinar su vida media en suero y la conservación de la actividad específica. En cada caso, el TNF se modificó con aproximadamente cinco a nueve moléculas de PEG. Los datos (Tabla 3) demuestran, sorprendentemente, que el TNF modificado con un PEG de un peso molecular promedio aproximado de aproximadamente 10.000 a 40.000, preferentemente de 20.000-30.000 aproximadamente, muestra una vida media en suero notablemente mayor conservando a la vez una alta actividad específica.

La vida media en suero de las distintas formulaciones de TNF se determinó por medio de ensayos ELISA obtenidos de Genzyme (Cambridge, MA), tal como lo sugería el fabricante. Se recogieron muestras de suero del plexo retroorbital utilizando tubos capilares heparinizados de 50 μ l. Se recogió una muestra de sangre pretratada justo antes de la inyección i.v. de las formulaciones de TNF o PEG-TNF. Se recogieron más muestras de sangre a los 30 minutos, a las 24 horas y a los 3, 7, 12 y 15 días tras el tratamiento. Se centrifugaron las muestras y se almacenó el sobrenadante resultante congelado a -20°C hasta su ensayo.

TABLA 3

Tratamiento	Vida Media en Suero (días)	% de Actividad Específica Conservada
SS-PEG 5000 TNF- α (2 pruebas)	4,4	55, 58
SS-PEG 12000 TNF- α (2 pruebas)	8,8	52,53
SS-PEG 20000 TNF- α	16	56
SS-PEG 30000 TNF- α	17	54
SS-PEG 40000 TNF- α	17	55
SS-PEG 5000 TNF- α	5	51
SP-PEG 20000 TNF- α	8	53
Succinimida-PEG 10000 TNF- α de cadena ramificada	7	49
Succinimida-PEG 20000 TNF- α de cadena ramificada	16	52
Succinimida-PEG 40000 TNF- α de cadena ramificada	18	54

ES 2 275 300 T3

Ejemplo 3

Se prepararon muestras adicionales de TNF humano recombinante modificado con PEG y se sometieron a prueba para determinar la vida media en suero así como la conservación de la actividad específica. Los datos presentados en la Tabla 4 muestran que la vida media y la actividad específica pueden variar según el agente enlazante utilizado.

TABLA 4

Tratamiento (#PEG / TNF)	Vida Media en Suero (días)	% de Actividad Específica Conservada
SCM-PEG 5000 TNF- α (5-9 PEG)	5	54
Succnidimil éster aminoácido-PEG 5000 TNF- α (6-8 PEG)	4	55
Epóxido PEG 8000 TNF- α (sitio de fijación de amina primaria) (9-12 PEG)	6	38
Epóxido PEG 8000 TNF- α (sitio de fijación de hidroxilo) (10-20 PEG)	5	0
Glicidil éter PEG 5000 TNF- α (15 PEG)	12	0
Nitrofenil PEG 5000 TNF- α (6-9 PEG)	5	21
Triclorofenilcarbonato PEG 5000 TNF- α (12-15 PEG)	5	11
Tresilato PEG 5000 TNF- α (10-12 PEG)	2	8
Aldehído PEG 5000 TNF- α (1 PEG)	<1	100
Aldehído PEG 20000 TNF- α (1 PEG)	2	100
Isocianato PEG 5000 TNF- α (5-12 PEG)	9	19
Vinilsulfona PEG 5000 TNF- α (4 PEG)	3	12
Maleimida PEG 5000 TNF- α (3 PEG)	3	43

ES 2 275 300 T3

Ejemplo 4

Se realizaron pruebas adicionales para evaluar el efecto del TNF humano recombinante modificado con PEG en ratones inoculados con distintas variedades de células tumorales. El TNF utilizado en estas pruebas se modificó con SS-PEG 20000 de acuerdo con el método descrito por Harras, *Supra*. A los ratones se les inyectaron 1×10^6 células tumorales y dos semanas más tarde se les inyectó i.p. PEG-TNF una vez a la semana durante tres semanas. Se definió la curación como el porcentaje de animales que sobrevivían cinco veces más tiempo que los animales no tratados. Se presentan los resultados en la Tabla 5 e indican que el TNF modificado de esta invención es eficaz en el tratamiento de los tumores de tipo melanoma, tumores renales, tumores del colon y tumores de mama.

TABLA 5

Tipo de Tumor	Línea Celular	Dosis de PEG-TNF, I.U.	% Curación
Melanoma	BL6	10	75
		30	100
		100	100
Riñón	G401	10	80
		30	80
Colon	HT29	10	40
		30	60
		100	80
Mama	MCF7	10	0
		30	0
		100	20
Cerebral	SW1088	100	0
Leucemia	L1210	100	0
Hepatoma	Hep3B	100	0

ES 2 275 300 T3

Ejemplo 5

Se realizaron estas pruebas para evaluar el TNF procedente de diversas fuentes modificado con PEG. Se presentan los resultados en la Tabla 6.

TABLA 6

Proteína TNF	Actividad Específica	LD50	Hipotensión ED50	Antitumoral ED50
TNF murina recom. producido en <i>Pichea</i>	$2,1 \times 10^7$ IU/mg	20 μ g	1 μ g	> 1.000 IU
"- modificado con SS-PEG MW 20000	$1,0 \times 10^7$ IU/mg	100 μ g	2 μ g	20 IU
TNF murina recom. producido en <i>E. coli</i>	$2,0 \times 10^7$ IU/mg	70 μ g	1 μ g	> 3.000 IU
"- modificado con SS-PEG MW 20000	$1,0 \times 10^7$ IU/mg	300 μ g	4 μ g	20 IU
TNF humano mutado por delección de los aminoácidos 212-220	$2,1 \times 10^7$ IU/mg	60 μ g	1 μ g	> 2.000 IU
"- modificado con SS-PEG MW 20000	$0,9 \times 10^7$ IU/mg	100 μ g	5 μ g	10 IU
TNF humano mutado por cambio de lisina 248, 592, 508 en alanina	$1,5 \times 10^7$ IU/mg	300 μ g	100 μ g	> 1.000 IU
"- modificado con SS-PEG MW 20000	$0,5 \times 10^7$ IU/mg	>1.000 μ g	>100 μ g	5 IU

REIVINDICACIONES

- 5 1. TNF modificado que comprende TNF unido covalentemente a entre aproximadamente cinco y doce moléculas de PEG con un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000.
2. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho PEG tiene un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 30.000.
- 10 3. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho PEG está unido covalentemente a dicho TNF a través de un agente enlazante biocompatible.
4. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho agente enlazante es N-hidroxisuccinimidil succinato.
- 15 5. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho agente enlazante es N-succinimidil propionato.
6. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho TNF está unido covalentemente a cinco hasta nueve moléculas aproximadamente de PEG.
7. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho TNF está unido covalentemente a dichas moléculas de PEG a través de aminas primarias en el TNF.
- 25 8. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho TNF es TNF- α .
9. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho TNF es TNF humano aislado.
10. TNF modificado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho TNF es TNF humano recombinante.
- 30 11. Método para aumentar la vida media en la circulación sanguínea del TNF que comprende la modificación de dicho TNF mediante la unión covalente del mismo a entre aproximadamente cinco y doce moléculas de PEG con un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000.
- 35 12. Método para aumentar la actividad tumoricida del TNF que comprende la modificación de dicho TNF mediante la unión covalente del mismo a entre aproximadamente cinco y doce moléculas de PEG con un peso molecular promedio en peso aproximado en el rango de 20.000 a 40.000.
- 40 13. Utilización de una cantidad terapéuticamente eficaz del TNF modificado según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un paciente que padece de tumores.
14. Utilización según la reivindicación 13, **caracterizada** porque dicho tumor es un melanoma.
15. Utilización según la reivindicación 13, **caracterizada** porque dicho tumor es un cáncer de colon.
- 45 16. Utilización según la reivindicación 13, **caracterizada** porque dicho tumor es un cáncer de riñón.
17. Utilización según la reivindicación 13, **caracterizada** porque dicho tumor es un cáncer de mama.

50

55

60

65

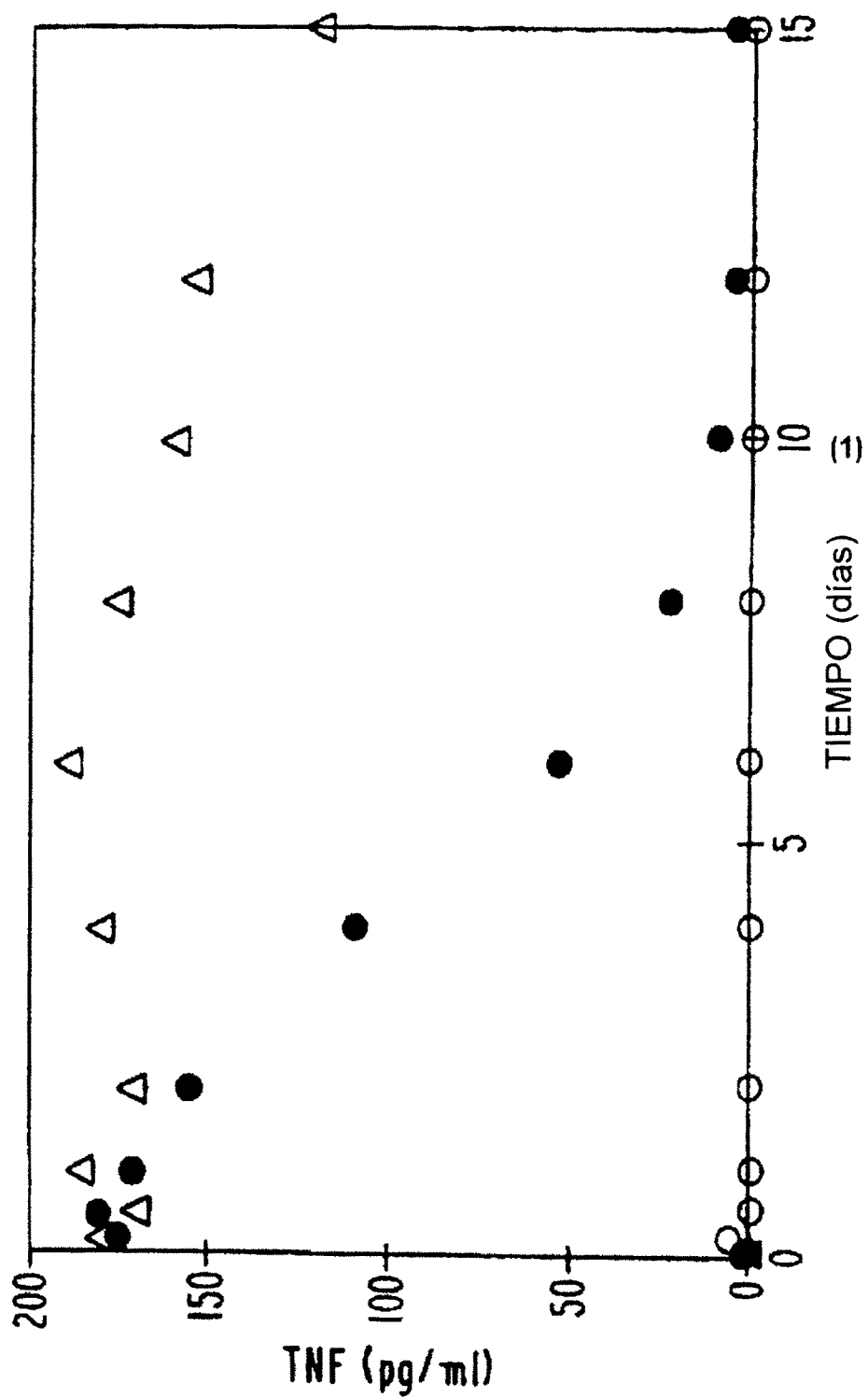


Fig. 1

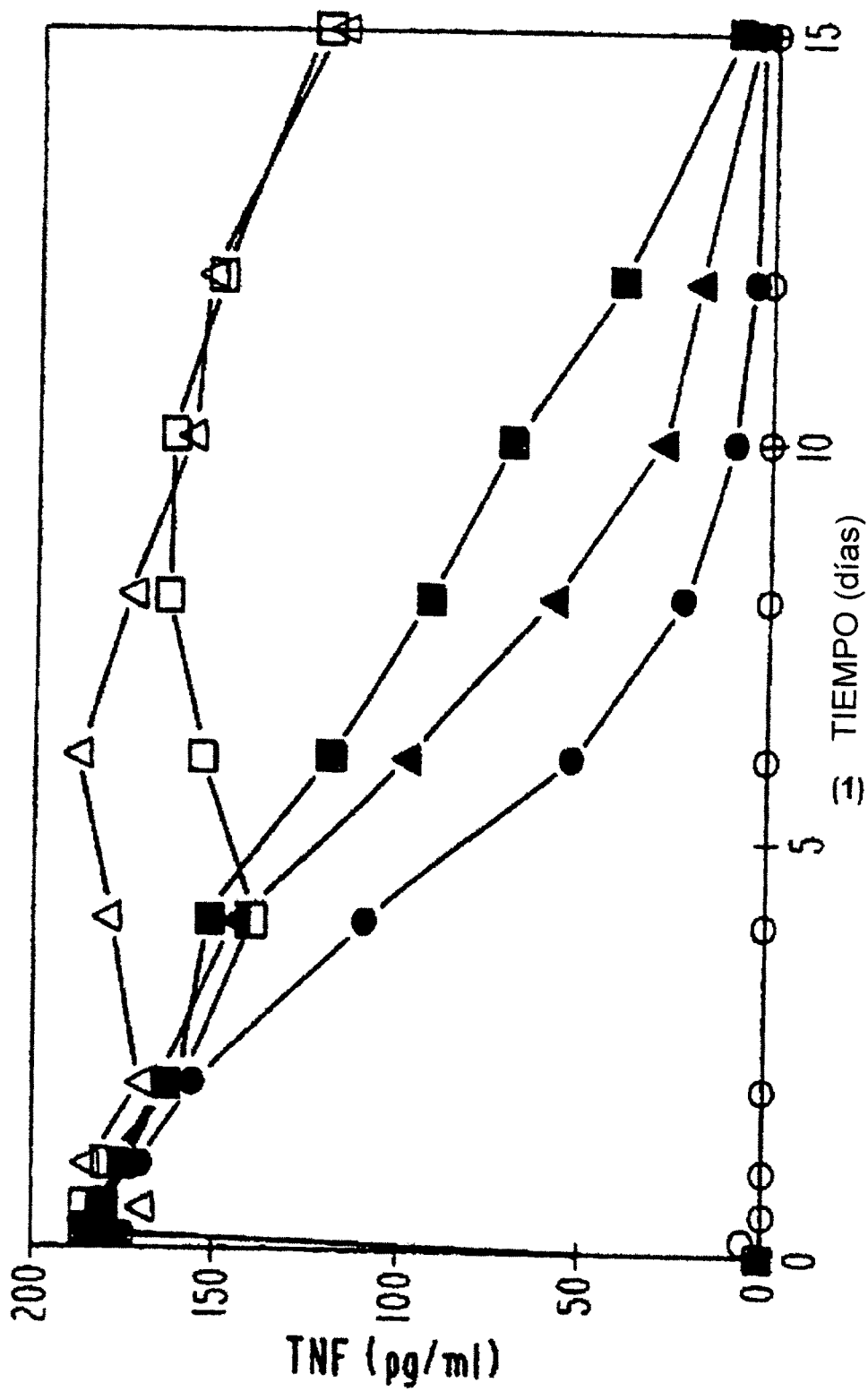


Fig. 2