



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 014**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99909244 .8**  
86 Fecha de presentación : **19.03.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0982037**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2000**

54 Título: **Uso de TCF-II para prevenir o tratar la sepsis.**

30 Prioridad: **19.03.1998 JP 10-70914**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

73 Titular/es: **Daiichi Sankyo Company, Limited**  
**3-5-1, Nihonbashi Honcho**  
**Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es: **Tani, Tohru y**  
**Kondo, Hiroyuki**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 288 014 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**

Uso de TCF-II para prevenir o tratar la sepsis.

**5 Campo técnica**

La presente invención se refiere al uso del Factor Citotóxico de Tumores-II (TCF-II) como un ingrediente eficaz en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar la sepsis. Por la presente invención, se proporciona un agente terapéutico para prevenir y/o tratar la sepsis causada por más de un factor seleccionado entre el grupo compuesto por enfermedad infecciosa, quemaduras, cirugía, cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), radioterapia, quimioterapia, nutrición parenteral total a largo plazo (TPN) y es útil como una medicina.

**Técnica anterior**

La sepsis es una enfermedad infecciosa sistémica generalmente grave que se desarrolla por la invasión continua o intermitente de bacterias o productos secretados por ellas en la sangre desde un foco infeccioso bacteriano presente en algún sitio en un tejido u órgano del cuerpo humano. La sepsis se induce por quimioterapia usando corticosteroides o agente antitumoral, etc., radioterapia como radiación con cobalto, o tratamiento u operación tal como catéter de auto-retención, diálisis de la sangre, trasplante de órgano, cirugía cardíaca etc. en un paciente con tumor maligno, leucemia, linfoma maligno, SIDA, enfermedad del colágeno, insuficiencia renal, enfermedad hepática, enfermedad cerebrovascular o diabetes o en un hospedador con resistencia disminuida tal como inmunodeficiencia humoral o inmunodeficiencia celular de una persona anciana o un bebé inmaduro. Recientemente, aunque se han desarrollado diversos tipos de antibióticos y se han usado clínicamente para el tratamiento de la sepsis, han surgido diversos tipos de bacterias resistentes a antibióticos, tales como *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina o meticilina, de modo que el índice de mortalidad de pacientes con sepsis aún es de aproximadamente el 25% y muchos pacientes mueren debido a sepsis cada año.

Como bacterias que inducen sepsis, además de las bacterias resistentes a antibióticos mencionadas anteriormente, se ejemplifican enterococos, bacilos gram-negativos tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* y *Proteus*, etc. Entre estos, un paciente con sepsis debido a bacilos gram-negativos padece hipertermia, temblores por escalofríos, taquicardia, ligera depresión de la presión sanguínea, depresión de la resistencia periférica, hipercinemia, hiperventilación, alcalosis respiratoria, hiperlactacidemia y a veces fallo cardíaco en fase temprana, seguido de depresión de la presión sanguínea y rendimiento cardíaco e incurriendo en afecciones graves que vienen acompañadas de acidosis metabólica, afectación de la conciencia, acroagnosis, hipogluceemia y a veces provocando muerte. Por lo tanto, el tratamiento de la sepsis se considera un objeto importante.

Se cree principalmente que las bacterias invaden cuerpos vivos por dos diferentes tipos de vía. Una es el caso exógeno tal como catéter intravenoso de auto-retención o aguja de punción usada en infusión o infusión suplementaria, y la otra es el caso endógeno tal como invasión de bacterias ampliamente distribuidas en el cuerpo humano vivo tal como intestino etc.

La transferencia de bacterias o productos secretados por ellas desde el intestino se llama translocación bacteriana o translocación de endotoxinas y se aprecia como un interruptor que induce sepsis. Dicha translocación de bacterias y/o productos secretados por ellas desde el intestino se observa cuando un paciente está gravemente dañado por una quemadura, cirugía mayor, etc., y cuando un paciente después de cirugía o un paciente con afectación de la conciencia recibe tratamiento TPN a largo plazo y llega a tener graves problemas.

Para el tratamiento de la sepsis que comprende esta translocación bacteriana, primero se elige el tratamiento con antibióticos y se reconoce que tienen cierto nivel de efectos. Sin embargo, se cree que el tratamiento con antibióticos tiene su límite debido a sus efectos secundarios, la aparición de bacterias resistentes a antibióticos y sus pocos efectos sobre los síntomas de choque. Además, se realiza un suplemento de la nutrición por infusión o tratamiento por  $\gamma$ -globulina pero esto está dirigido a la recuperación de la inmunidad del hospedador y sigue siendo un tratamiento auxiliar para el tratamiento con antibióticos. Por tanto, no existe tratamiento eficaz para la sepsis.

**55 Descripción de la invención**

Se ha estudiado con entusiasmo para descubrir un agente terapéutico para la sepsis y se descubrió que TCF-II conocido como factor citotóxico de tumor tenía un excelente efecto para prevenir y tratar la sepsis. Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico para prevenir y/o tratar la sepsis causada por más de un factor seleccionado entre el grupo compuesto por quemaduras, cirugía, cáncer, SIDA, radioterapia, quimioterapia y TPN a largo plazo, que comprende TCF-II como un ingrediente eficaz.

La presente invención proporciona el uso de TCF-II como un ingrediente eficaz en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar la sepsis. El agente terapéutico es útil para prevenir y/o tratar la sepsis causada por más de un factor seleccionado entre el grupo compuesto por quemaduras, cirugía, cáncer, SIDA, radioterapia, quimioterapia y TPN a largo plazo.

## ES 2 288 014 T3

TCF-II es un ingrediente eficaz de la presente invención, una proteína conocida derivada de fibroblasto humano y tiene las siguientes propiedades:

1) Peso molecular (electroforesis SDS) en condiciones no reductoras;  $78.000 \pm 2.000$  ó  $74.000 \pm 2.000$  en condiciones reductoras;  $52.000 \pm 2.000$  (banda A común)  $30.000 \pm 2.000$  (banda B)  $26.000 \pm 2.000$  (banda C)

2) Punto isoeléctrico; 7,4-8,6.

El anterior TCF-II puede obtenerse por un método de condensación del medio de cultivo de fibroblasto humano, adsorción del condensado en resina de intercambio iónico y purificación del eluyente por cromatografía de afinidad en columna (documento WO90/10651) o por una manipulación de ingeniería genética (documento WO92/01053).

TCF-II como ingrediente activo de la presente invención puede ser TCF-II derivado de fibroblasto humano IMR-90 o TCF-II modificado genéticamente usando microorganismos u otras líneas celulares basadas en la secuencia genética descrita en la publicación de patente WO 90/10651. También pueden usarse el TCF-II obtenido por manipulación de ingeniería genética descrito en la publicación de patente WO92/01053. En dicho caso, puede usarse TCF-II con diferente cadena de polisacárido o sin cadena de polisacárido debido a la diferencia de la célula hospedadora o microorganismo pero es preferible TCF-II con cadena de polisacárido. El TCF-II obtenido por estos métodos puede condensarse y purificarse por un método de aislamiento y purificación habitual. Por ejemplo, pueden ejemplificarse precipitación usando disolvente orgánico, desalado, filtración en gel, cromatografía de afinidad usando anticuerpo monoclonal y electroforesis. La purificación por cromatografía de afinidad usando anticuerpo monoclonal puede usar anticuerpo monoclonal descrito en la solicitud de patente no examinada publicada japonesa N° 97 (1993). El TCF-II purificado obtenido puede liofilizarse o mantenerse congelado. Pueden usarse otras sustancias que muestren la misma actividad que TCF-II como el mismo agente terapéutico. Por ejemplo, pueden ejemplificarse el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF; solicitud de patente no examinada publicada japonesa N° 22526/1988) que es diferente de la proteína TCF-II en cinco aminoácidos o el Factor de Dispersión Purificado (SF; Gherardi y Stocker Nature, 346, 228 (1990)).

El agente terapéutico para prevenir y/o tratar la sepsis puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea como inyecciones. Estas preparaciones pueden producirse de acuerdo con un método de preparación conocido y pueden añadirse a las mismas acondicionantes del pH, tampones, estabilizadores si es necesario. La dosis del agente terapéutico para un paciente depende del grado de los síntomas, estado de salud, edad y peso corporal de un paciente dado. Aunque no está específicamente restringida, puede administrarse 0,6-600 mg, preferiblemente 6-60 mg, de TCF-II purificado una vez al día para un paciente adulto.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los efectos de TCF-II en animales modelo de sepsis por punción en el ciego en el ejemplo 1.

- representa el grupo de vehículo administrado y
- representa el grupo de TCF-II administrado.

La Figura 2 muestra los efectos de TCF-II en translocación bacteriana inducida por LPS en el ejemplo 2.

- representa el grupo de vehículo administrado y
- representa el grupo de TCF-II administrado.

### Mejor modo de realizar la invención

La presente invención se describirá ahora más específicamente por los siguientes ejemplos pero estos están simplemente ejemplificados y el alcance de la presente invención no se restringe por estos ejemplos.

#### Ejemplo preparativo 1

##### *Purificación de TCF-II*

De acuerdo con un método descrito en el documento WO90/10651 y un método de Higashio *et al.* (Higashio, K. *et al.*, B. B. R. C., vol. 170, pág. 397-404 (1990)), se cultivó una célula y se obtuvo TCF-II purificado. Es decir, se sembraron  $3 \times 10^6$  células IMR-90 de fibroblasto humano (ATCC CCL186) en un frasco rotatorio que contenía 100 ml de medio DMEM que incluía suero de ternera fetal al 5% y se cultivó rotándolo a la velocidad de 0,5-2 rpm durante 7 días. Cuando la cantidad total de células alcanzó  $1 \times 10^7$  células, se privaron de la pared por digestión con tripsina y se recogieron en la parte inferior del frasco. Y se esterizaron 100 g de cerámica con un tamaño de mala 5 - 9 (Toshiba Ceramic) y se pusieron en el mismo, que se cultivó durante 24 horas. Después de ello, se añadieron 500 ml del medio de cultivo anterior al mismo y se continuó el cultivo. El volumen total del medio de cultivo se recuperó cada 7-10 días y se suplementó medio reciente. La producción se mantuvo durante 2 meses de este modo y se recuperaron 4 litros de medio de cultivo por un frasco rotatorio. La actividad específica de TCF-II en medio de cultivo obtenido como

## ES 2 288 014 T3

anteriormente fue 32  $\mu\text{g/ml}$ . El medio de cultivo (750 l) se concentró por ultrafiltración usando filtro de membrana (corte PM 6.000; Amicon) y se purificó por cromatografía de 4 etapas, es decir, CM- Sephadex C-50 (Pharmacia), Con-A Sepharose (Pharmacia), columna Mono S (Pharmacia), Heparina-Sepharose (Pharmacia) para producir TCF-II purificado.

5 Ejemplo preparativo 2

### *Producción de TCF-II recombinante*

10 De acuerdo con un método descrito en el documento WO92/01053, se cultivó la célula transformada con el gen de TCF-II y se obtuvo TCF-II purificado. Es decir, se cultivó la célula Namalwa transformada y se obtuvieron 20 l de medio de cultivo. Este medio de cultivo se trató por cromatografía en CM-Sephadex C-50, cromatografía en Con-A Sepharose CL-6B y finalmente HPLC equipado con una columna Mono S para producir aproximadamente 11 mg de TCF-II recombinante.

15 Ejemplo preparativo 3

### *Producción de preparación farmacéutica de TCF-II*

20 A continuación se muestra un ejemplo para producir inyecciones de TCF-II obtenidas de los ejemplos preparativos 1 y 2

25	(1)	TCF-II	20 $\mu\text{g}$
		Albúmina sérica humana	100 mg

La composición anterior se disolvió en solución de tampón ácido cítrico con pH 6,03 de modo que el volumen total fuera 20 ml.

30 Después, se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después e liofilización.

35	(2)	TCF-II	40 $\mu\text{g}$
		Tween 80	1 mg
		Albúmina sérica humana	100 mg

40 La composición anterior se disolvió en solución salina fisiológica para inyecciones de modo que el volumen total fuera 20 ml.

Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

45	(3)	TCF-II	20 $\mu\text{g}$
		Tween 80	2 mg
		Sorbitol	4 g

50 La composición anterior se disolvió en solución de tampón ácido cítrico con pH 6,03 de modo que el volumen total fuera 20 ml.

55 Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

60	(4)	TCF-II	40 $\mu\text{g}$
		Tween 80	1 mg
		Glicina	2 g

65 La composición anterior se disolvió en solución salina fisiológica para inyecciones de modo que el volumen total fuera 20 ml.

## ES 2 288 014 T3

Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

5	(5)	TCF-II	40 $\mu$ g
		Tween 80	1 mg
		Sorbitol	2 g
		Glicina	1 g

10

La composición anterior se disolvió en solución salina fisiológica para inyecciones de modo que el volumen total fuera 20 ml.

15 Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

	(6)	TCF-II	20 $\mu$ g
		Sorbitol	4 g
20		Albúmina sérica humana	50 mg

25

La composición anterior se disolvió en solución de tampón ácido cítrico con pH 6,03 de modo que el volumen total fuera 20 ml.

Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

30	(7)	TCF-II	40 $\mu$ g
		Glicina	2 g
		Albúmina sérica humana	50 mg

35 La composición anterior se disolvió en solución salina fisiológica para inyecciones de modo que el volumen total fuera 20 ml.

Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

40

	(8)	TCF-II	40 $\mu$ g
		Albúmina sérica humana	50 mg

45

La composición anterior se disolvió en solución de tampón ácido cítrico con pH 6,03 de modo que el volumen total fuera 20 ml.

Después se dividió en viales que contenían 2 ml cada uno después de esterilización y se precintaron después de liofilización.

50

### Ejemplo 1

#### *Efectos de TCF-II en ratas con sepsis por punción de ciego*

55

Se prepararon animales modelo de sepsis por punción del ciego con una aguja de inyección 22G usando ratas SD macho de 7 semanas de edad (J. Surgical Research 29, 189-201 (1980)). A las 48 horas antes de preparar el modelo de sepsis, los animales se dividieron en dos grupos compuestos por un grupo de control al que se le administraría solamente vehículo (grupos de vehículo administrado) (n = 15) y un grupo de TCF-II administrado (n = 11). Se les administró por vía intravenosa vehículo o TCF-II (1000  $\mu$ g/kg) 5 veces cada 12 horas. El resultado del cambio del índice de supervivencia de animales hasta 2 días después de preparar el modelo de sepsis se muestra en la Figura 1. Como los resultados, el índice de supervivencia en el día 2 del grupo de TCF-II administrado era significativamente mayor que el del grupo de vehículo administrado, que demostró que la administración de TCF-II aumentaba significativamente el índice de supervivencia de ratas sépticas. Es decir, se confirmó que TCF-II mejoraba el índice de supervivencia de individuos con sepsis.

65

Ejemplo 2

*Efectos de la administración de TCF-II en translocación bacteriana inducida por LPS*

5 Se administró por vía intravenosa LPS en ratones ICR macho de 7 semanas de edad (5 mg/kg). A las 30 horas antes de la administración de LPS, los animales se dividieron en 2 grupos compuestos por un grupo de control al que se le administraría solamente vehículo (grupo de vehículo administrado) (n = 6) y grupo de TCF-II administrado (n = 6). Se les administró por vía intravenosa vehículo o TCF-II (200 µg/kg) 3 veces cada 12 horas. El resultado de la cantidad de bacterias detectadas en ganglio linfático mesentérico a las 24 horas después de la administración de LPS se muestra en la Figura 2. La cantidad detectada de bacterias en el grupos de TCF-II administrado fue significativamente inferior que la del grupos de control, que demostró que la administración de TCF-II suprimía significativamente la translocación inducida por LPS de bacterias desde el intestino.

15 Es decir, se confirmó que TCF-II mejoraba significativamente el índice de supervivencia contra la translocación bacteriana que puede ser el interruptor para inducir la sepsis.

**Utilidad industrial**

20 Por la presente invención, se proporciona TCF-II como un ingrediente eficaz en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la sepsis. El agente terapéutico es útil para prevenir y/o tratar la sepsis causada por más de un factor seleccionado entre el grupo compuesto por enfermedad infecciosa, quemaduras, cirugía, cáncer, SIDA, radioterapia, quimioterapia, TPN a largo plazo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Uso del Factor Citotóxico de Tumor-II (TCF-II) como un ingrediente eficaz en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar la sepsis.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

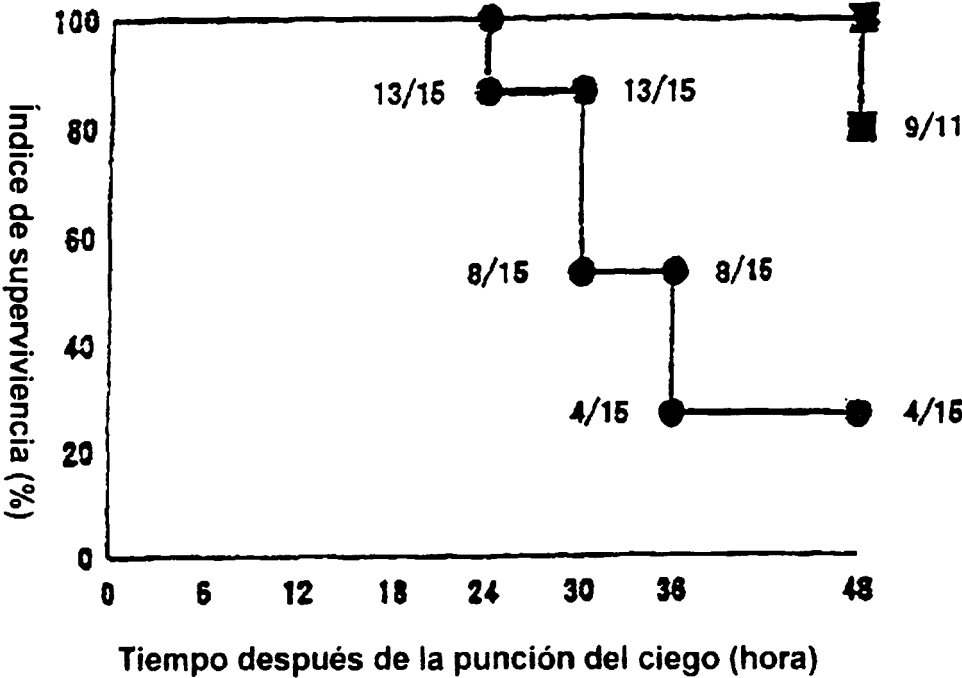


Figura 2

