



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 136**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03714791 .5**

96 Fecha de presentación : **07.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1482964**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54

Título: **Uso de inhibidores de la transactivación de EGFR en cáncer humano.**

30

Prioridad: **08.03.2002 EP 02005452**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2011

73

Titular/es: **Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE**

72

Inventor/es: **Ullrich, Axel;
Schäfer, Beatrix;
Fischer, Oliver;
Gschwind, Andreas y
Leserer, Michael**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 359 136 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 inhibidores de la transactivación de EGFR en cáncer humano

5 La presente invención se refiere al uso de un compuesto que es capaz de inhibir la activación de receptores del factor de crecimiento de la familia EGFR para la prevención o el tratamiento de procesos asociados con una transducción incrementada de señales mediada por proteína G.

10 La señalización a través de tirosina quinasas (RTK- siglas en inglés) receptoras está implicada en la regulación de procesos celulares fundamentalmente importantes, y se ha demostrado que su sobre-regulación está relacionada con enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer. Receptores acoplados a proteína G (GPCR – siglas en inglés) constituyen el grupo mayor de receptores de la superficie celular que controlan múltiples cascadas de señalización y su resultado biológico. Recientemente, se ha descrito una interferencia entre los miembros de las dos familias de receptores que conecta a multitud de diferentes estímulos a través de ligandos de GPCR con la capacidad de señalización de RTKs tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR- siglas en inglés), véase, p. ej. el documento WO 01/12182. El mecanismo de señalización que implica desprenderse de precursores del factor de crecimiento por parte de una metaloproteasa ha conducido a los autores de la invención a proponer el modelo de la vía de señal de paso por la membrana triple (TMPS – siglas en inglés).

20 El objetivo de los autores de la invención era investigar los procesos fisiológicos que son regulados por la vía de TMPS y su importancia en fenómenos patofisiológicos tales como el progreso neoplásico. Por lo tanto, los autores de la invención rastrearon líneas de células cancerígenas humanas en cuanto a la transactivación de EGFR mediante estimulación con ligandos de GPCR, así como la inhibición de metaloproteasas. Específicamente, dichos autores investigaron episodios estimulados por el factor de crecimiento en la transducción de señales y en procesos fisiológicos definidos.

25 Sus resultados demuestran que los episodios de fosforilación de EGFR así como de señalización aguas abajo tales como el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos se produce después de la estimulación con ligandos de GPCR y son sub-regulados por el inhibidor de metaloproteasa batimastat. Adicionalmente, la fosforilación basal del EGFR es sensible a batimastat. Además, los autores de esta invención revelaron que la transactivación de EGRF es parte del sistema regulador que modula el progreso del ciclo celular y la proliferación de las células. La vía TMPS es también capaz de fomentar la anti-apoptosis y la migración e invasividad celular.

30 Mientras que las células somáticas requieren señales mitogénicas externas, las células cancerígenas se caracterizan por un comportamiento en el crecimiento anormal debido a la producción autocrina de factores mitogénicos. Dado que muchos de éstos son ligandos de GPCR, la transactivación de EGFR constituye un mecanismo para la progresión del cáncer mediante la des-regulación de la proliferación de células y la supresión de la muerte de las células. Por lo tanto, la inhibición de esta vía es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer.

35 Así, una materia objeto descrita es el uso de un compuesto que es capaz de inhibir la activación de un receptor del factor de crecimiento de la familia EGFR para la fabricación de un agente para la prevención o el tratamiento de procesos seleccionados de la proliferación celular, la migración de células, la invasividad y la anti-apoptosis en un trastorno, que está asociado con una transducción incrementada de señales mediada por proteína G y que se selecciona de cáncer de colon, riñones, vejiga, próstata, mama, pulmones u ovarios, en donde el compuesto es un anticuerpo que es capaz de unirse a pro HB-EGF.

40 Sorprendentemente, se encontró que la inhibición de la activación del receptor del factor de crecimiento provocada por una transducción incrementada de señales mediada por proteína G conduce a una inhibición del progreso del cáncer, particularmente a la migración de células y a la invasividad, así como a una inhibición de la anti-apoptosis. Así, inhibidores de la activación del receptor del factor de crecimiento inducida por GPCR son adecuados para la fabricación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de indicaciones específicas de enfermedades hiper-proliferativas asociadas con la proliferación celular, la migración de células, la invasividad y/o la anti-apoptosis y para restablecer el control de estos fenómenos en las células u organismos tratados, respectivamente.

45 El receptor del factor de crecimiento es EGFR u otro miembro de la familia EGFR tal como HER-2, HER-3 o HER-4.

50 El compuesto puede actuar sobre un precursor del ligando del receptor del factor de crecimiento, que es preferiblemente una molécula asociada a la membrana. El precursor del ligando del factor de crecimiento es pro-

HB-EGF, el cual es escindido a HB-EGF por parte de una proteasa.

Un ejemplo de un compuesto que actúa sobre un precursor del ligando del receptor del factor de crecimiento es CRM 197, una forma catalíticamente inactiva de la toxina difteria que se une específicamente a pro-HB-EGF y que es capaz de bloquear el procesamiento de pro-HB-EGF. Un ejemplo adicional es un anticuerpo que es capaz de unirse a pro-HB-EGF y que, con ello, bloquea su procesamiento.

Debe señalarse que la presente invención se refiere a una inhibición fijada como objetivo de vías de señales celulares "aguas abajo" de la transactivación de EGFR en células cancerígenas, particularmente en células cancerígenas humanas.

El trastorno a tratar o prevenir está asociado con y es provocado preferiblemente por una transducción incrementada de señales mediada por proteína G. Esta transducción incrementada de señales mediada por proteína G puede estar asociada con o ser provocada por un incremento patológico en la actividad de una proteína G y/o un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Debe señalarse que los trastornos que son prevenidos o tratados de acuerdo con la presente invención pueden delimitarse de otros trastornos hiperproliferativos que tienen una expresión potenciada del receptor del factor de crecimiento, debido a que tiene lugar una transactivación de la expresión del receptor del factor de crecimiento a través de las vías de señales de la proteína G. El trastorno es un tumor de colon, riñones, vejiga, próstata, mama, pulmones u ovarios.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su fin pretendido. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del compuesto que resulta para aliviar los síntomas o prolongar la supervivencia de un paciente. La toxicidad y la eficacia terapéutica de compuestos de este tipo se puede determinar mediante procesos farmacéuticos convencionales en cultivos de células o animales experimentales, p. ej. para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos en cultivos de células. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos con animales para lograr un intervalo de concentraciones circulante que incluye la CI50 según se determina en el cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semi-máxima de la actividad del receptor del factor del crecimiento). Una información de este tipo se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación entre DL50 y DE50. Se prefieren compuestos que exhiban altos índices terapéuticos. La formulación, la vía de administración y la dosificación exactas se pueden elegir por parte del médico individual a la vista del estado del paciente (véase, p. ej., Fingl et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1, pág. 1). La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos moduladores del receptor, o la concentración eficaz mínima (MEC – siglas en inglés). La MEC variará para cada compuesto, pero se puede estimar a partir de datos in vitro, p. ej. la concentración necesaria para conseguir una inhibición del 50-90% del receptor utilizando los ensayos descritos en esta memoria. Los compuestos deberían ser administrados utilizando un régimen que mantuviera los niveles en plasma por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre el 30-90% y, lo más preferiblemente, entre el 50-90%. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales de la vía de administración. En los casos de una administración local o de una absorción selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

La cantidad real de composición a administrar dependerá, naturalmente, del sujeto que esté siendo tratado, del peso del sujeto, de la gravedad de la dolencia, del modo de administración y del juicio del médico que la prescriba. Para batimastat, y otros compuestos es adecuada, p. ej., una dosis diaria de 1 a 200 mg/kg, en particular 10 a 100 mg/kg por día.

Además, la invención se explicará con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos:

EJEMPLO

1. MÉTODOS

1.1 Lisis celular, inmunoprecipitación e inmunotransferencia

Antes de la lisis, células, desarrolladas hasta un 80% de confluencia, fueron tratadas con inhibidores y agonistas y

fueron lisadas durante 10 min en hielo en tampón que contenía HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, pirofosfato de sodio 10 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, fluoruro de sodio 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 10 µg/ml de aprotinina. Los lisados se pre-aclararon mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron con un volumen igual de tampón HNTG y, subsiguientemente, se inmunoprecipitaron utilizando los respectivos anticuerpos y 30 µl de proteína A-sefarosa durante 4 h a 4°C. Los precipitados se lavaron tres veces con 0,5 ml de tampón HNTG, se suspendieron en tampón de muestra SDS y se sometieron a electroforesis en gel sobre geles al 7,5% o 10%. Después de SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron.

10 1.2 Ensayo de invasión

Se llevaron a cabo ensayos de invasión de células en cámaras de Boyden. Medio exento de suero que contenía el quimioattractante a ensayar se añade al pocillo inferior de una cámara de Boyden. Un filtro revestido con Matrigel se dispone sobre el pocillo inferior de la cámara de Boyden y se asegura con una junta. Las células se pre-incuban con el inhibidor durante 20 min y luego se añaden a los pocillos superiores de las cámaras en medio exento de suero. Las cámaras se incuban durante 6 h durante una noche en una incubadora humidificada con 7% de CO₂, a 37°C. Finalmente, las células se eliminan de la superficie superior con un bastoncillo de algodón y las células en la cara inferior se tiñen y recuentan bajo el microscopio.

20 1.3 Ensayo de migración

Ensayos de migración de células se llevaron a cabo también en cámaras de Boyden que contenían membranas de policarbonato (tamaño de poros de 8 µm) según se describe arriba.

25 1.4 Ensayo de la lesión de células

Células se hicieron crecer hasta confluencia en placas de seis pocillos en medio estándar y se analizaron utilizando un método de lesión por rayado clásico. Las células se rayaron suavemente con una punta de plástico. El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS. Se añadió medio exento de suero y se permitió a las células migrar a la zona de aclaramiento durante 24 h a 48 h. Los análisis se llevaron a cabo bajo el microscopio.

30 1.5 Incorporación de timidina

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos, crecidas hasta un 70% de confluencia, y después se incubaron en medio exento de suero durante 24 h para inducir la quiescencia. Después se añadieron estímulos mitogénicos en el instante 0, cuando se requería un tratamiento previo con inhibidores. Después de 18 h, se añadió 1 µCi de (metil-³H) timidina a cada pocillo. Cuatro horas más tarde, los medios de cultivo se retiraron, las células se lavaron con PBS, se fijaron con ácido tricloroacético al 10% enfriado con hielo. El material marcado se solubilizó después y luego se cuantificó la radiactividad asociada a las células mediante recuento por centelleo líquido.

40 1.6 Detección de la apoptosis

La apoptosis se midió mediante citometría de flujo. Las células se sembraron en placas de seis pocillos y se las privó de alimento. La apoptosis se indujo mediante anticuerpo anti-CD95 y al mismo tiempo se añadieron inhibidores y después mitógenos al cabo de 24 h. Al final del período de cultivo, las células se lavaron en PBS, se resuspendieron en tampón hipotónico que contenía 50 µg/ml de yoduro de propidio, se mantuvieron durante 2 h a 4°C en la oscuridad y se analizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de células apoptóticas se determinó evaluando los núcleos hipodiploides después de un bloqueo adecuado sobre el contenido en ADN.

50 2. RESULTADOS

Investigación de los procesos fisiológicos que son regulados mediante transactivación de EGFR a través de la vía de señal de paso por la membrana triple (TMPS):

1. Varias líneas de células cancerígenas humanas muestran una transactivación de EGFR mediante ligandos de GPCR así como inhibición de metaloproteasas.

2. Los resultados de los autores de esta invención demuestran que la fosforilación de EGFR así como episodios de señalización aguas abajo tales como el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno se producen después de la estimulación con ligandos de GPCR y se sub-regulan mediante el inhibidor de metaloproteasas batimastat. Adicionalmente, la fosforilación basal de EGFR es sensible a batimastat.

3. La transactivación de EGFR a través de la vía TMPS fomenta la proliferación de células, la anti-apoptosis y la migración e invasión de células.

Los resultados se resumen en las Figuras 1-7 y en la Tabla 1.

5

3. CONCLUSIONES

Las células cancerígenas se caracterizan por un comportamiento en el crecimiento anormal debido a la producción autocrina de factores mitogénicos. Dado que muchos de éstos son ligandos de GPCR, la transactivación de EGFR constituye un probable mecanismo para el progreso del cáncer mediante la des-regulación de la proliferación de células y la supresión de la muerte de las células. Por lo tanto, la inhibición de esta vía es una estrategia prometedora para el tratamiento de cáncer.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso de un compuesto que es capaz de inhibir la activación de un receptor del factor de crecimiento de la familia EGFR para la fabricación de un agente para la prevención o el tratamiento de procesos seleccionados de proliferación de células, migración de células, invasividad y anti-apoptosis en un cáncer, que está asociado con una transducción incrementada de señales mediada por proteína G y que se selecciona de cáncer de colon, riñones, vejiga, próstata, mama, pulmones u ovarios, en donde el compuesto es un anticuerpo que es capaz de unirse a pro-HB-EGF y, con ello, bloquea su procesamiento.
- 10 2.- El uso de la reivindicación 1, en donde el receptor del factor de crecimiento es EGFR.
- 3.- El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el agente es una composición farmacéutica que comprende al menos un soporte, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 15 4.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer es un cáncer humano.

FIGURA 2

La fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógeno después de estimulación con ligandos de GPCR se sub-regula mediante BB94 y AG1478

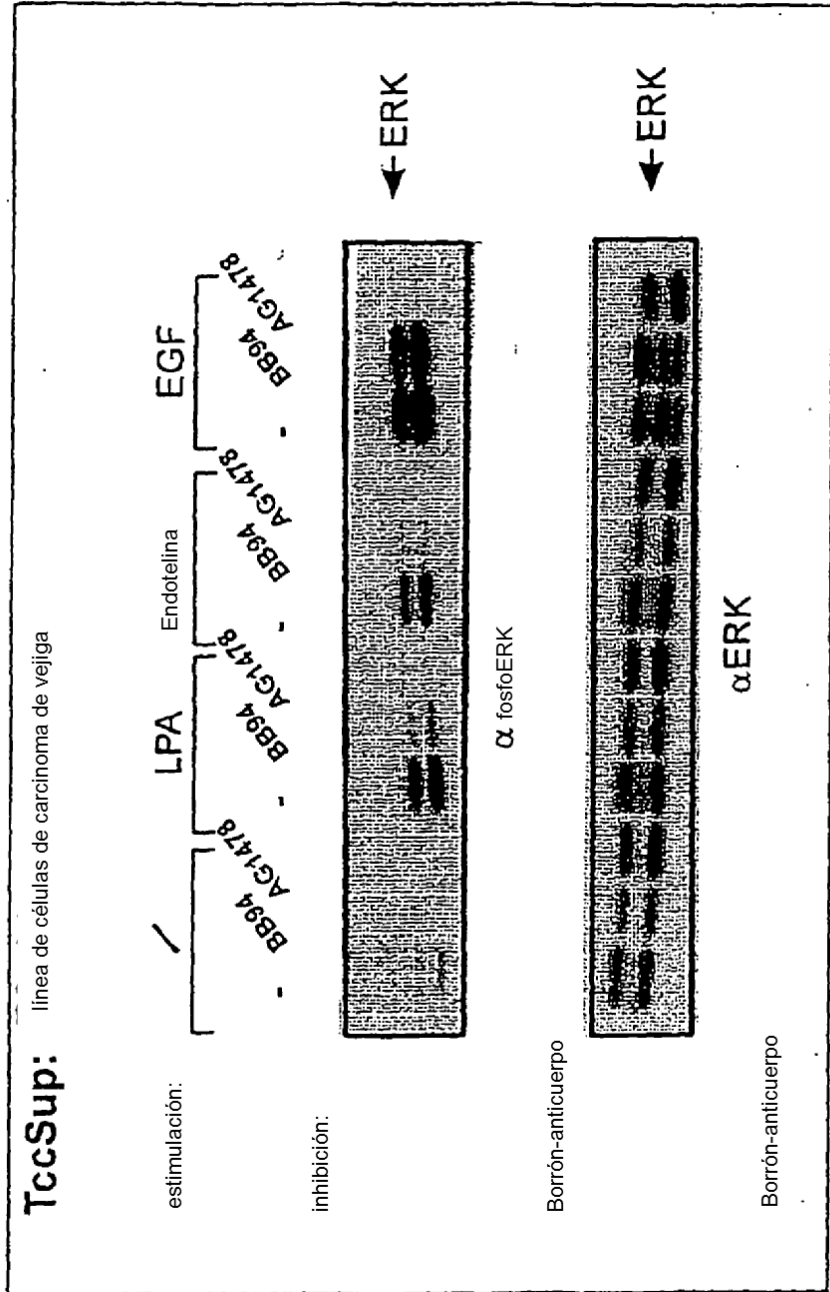


FIGURA 3

La proliferación inducida por LPA en la línea de células de cáncer de pulmón H292 puede ser inhibida por BB94 y AG1478

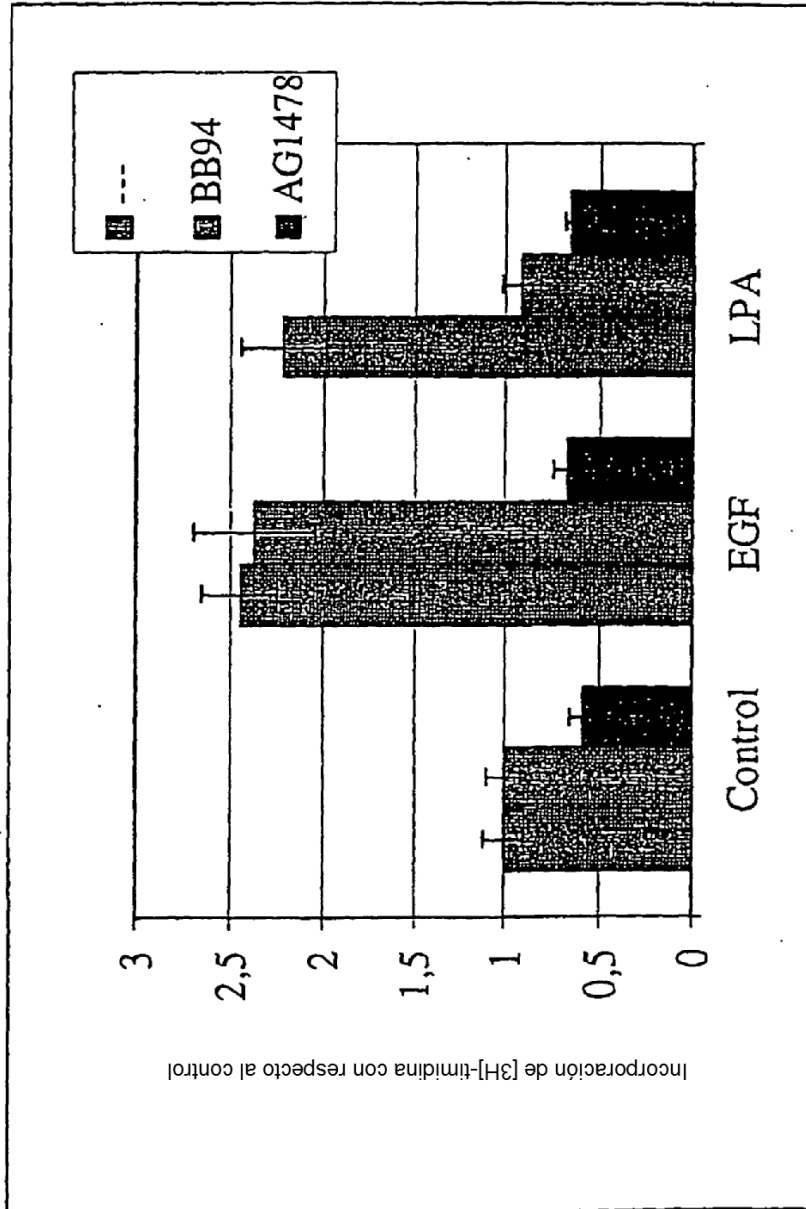


FIGURA 4

Los efectos antiapoptóticos inducidos por LPA en la línea de células de carcinoma de vejiga TccSup puede ser inhibida por BB94 y AG1478

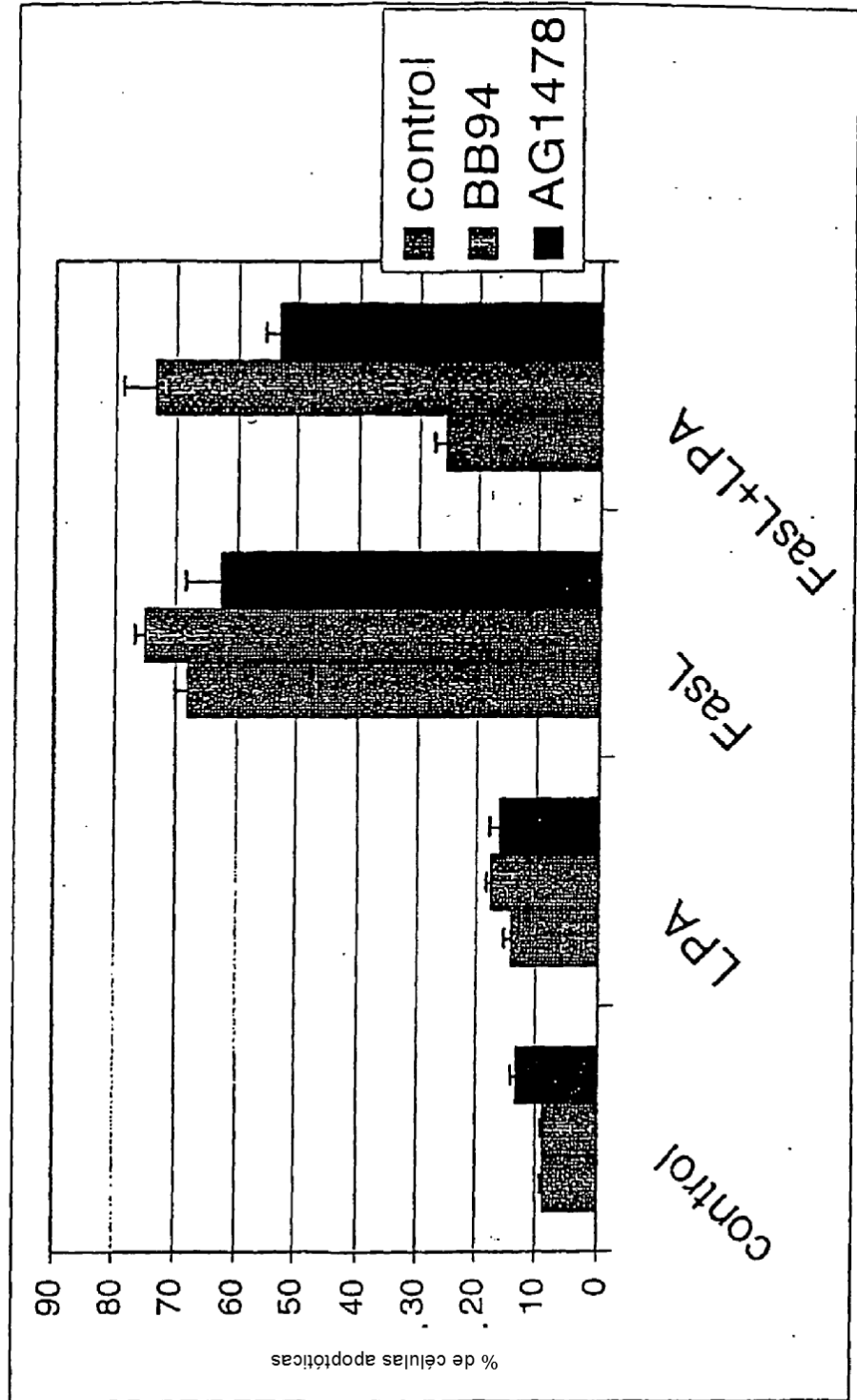


FIGURA 5

La migración inducida por LPA en la línea de células de carcinoma de riñón A498 puede ser inhibida por BB94 y AG1478

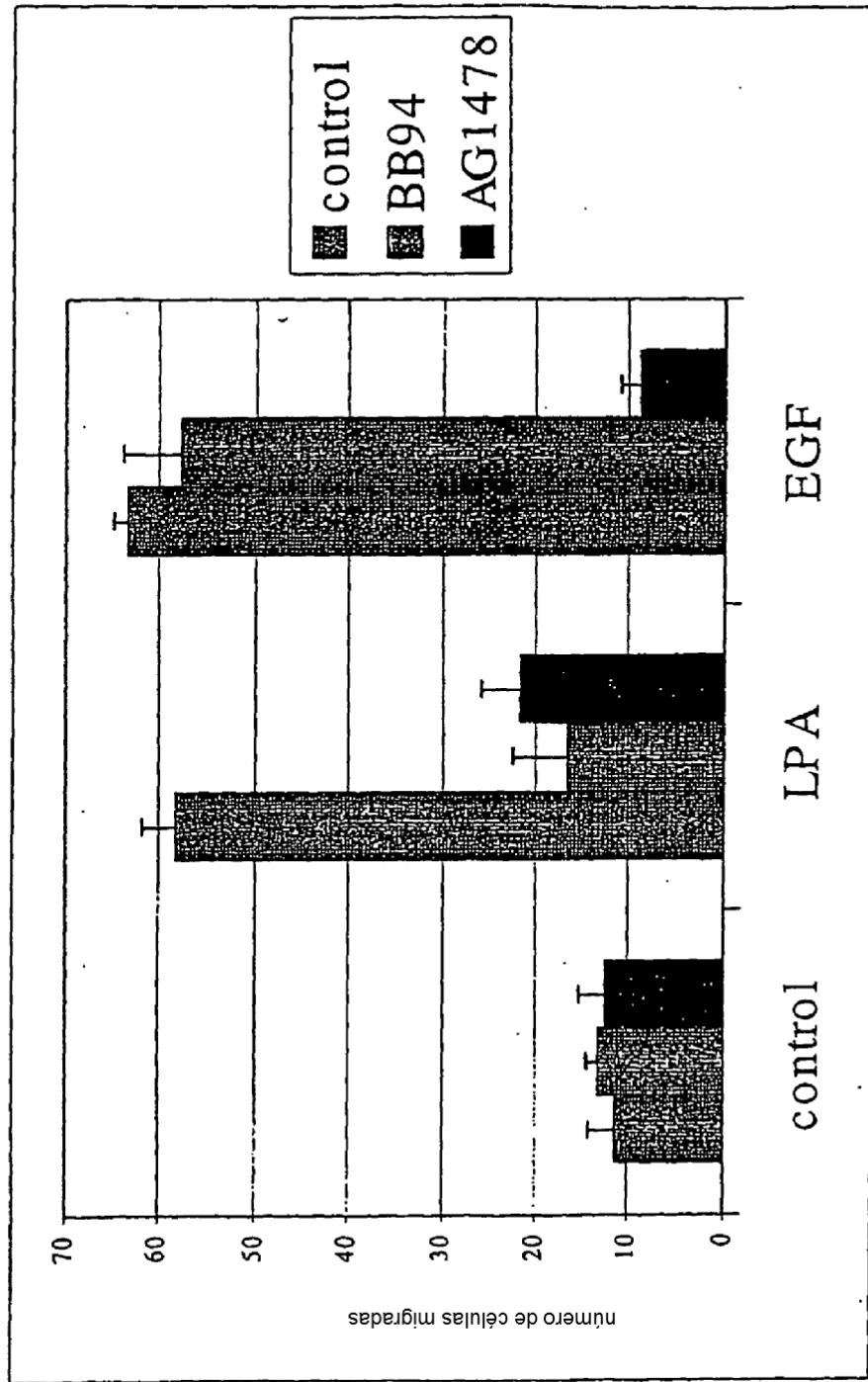


FIGURA 6

El cierre de las heridas inducido por LPA en la línea de células de carcinoma de riñón ACHN puede ser inhibida por BB94 y AG1478

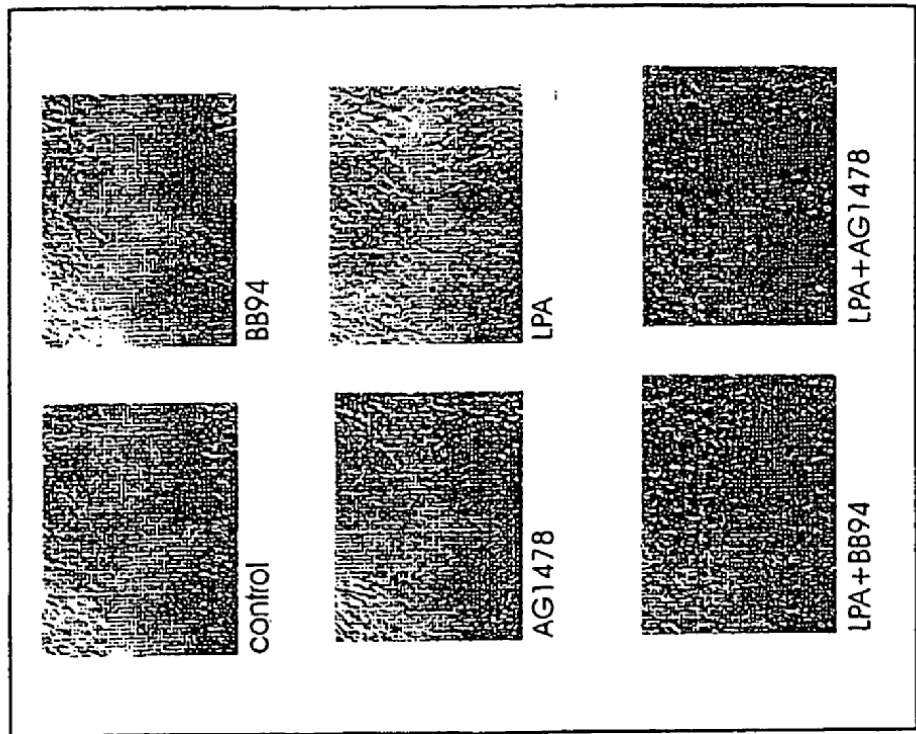


FIGURA 7

LPA fomenta la invasión en la línea de células de carcinoma de riñón CaKi2 que puede ser disminuida por BB94 y AG1478

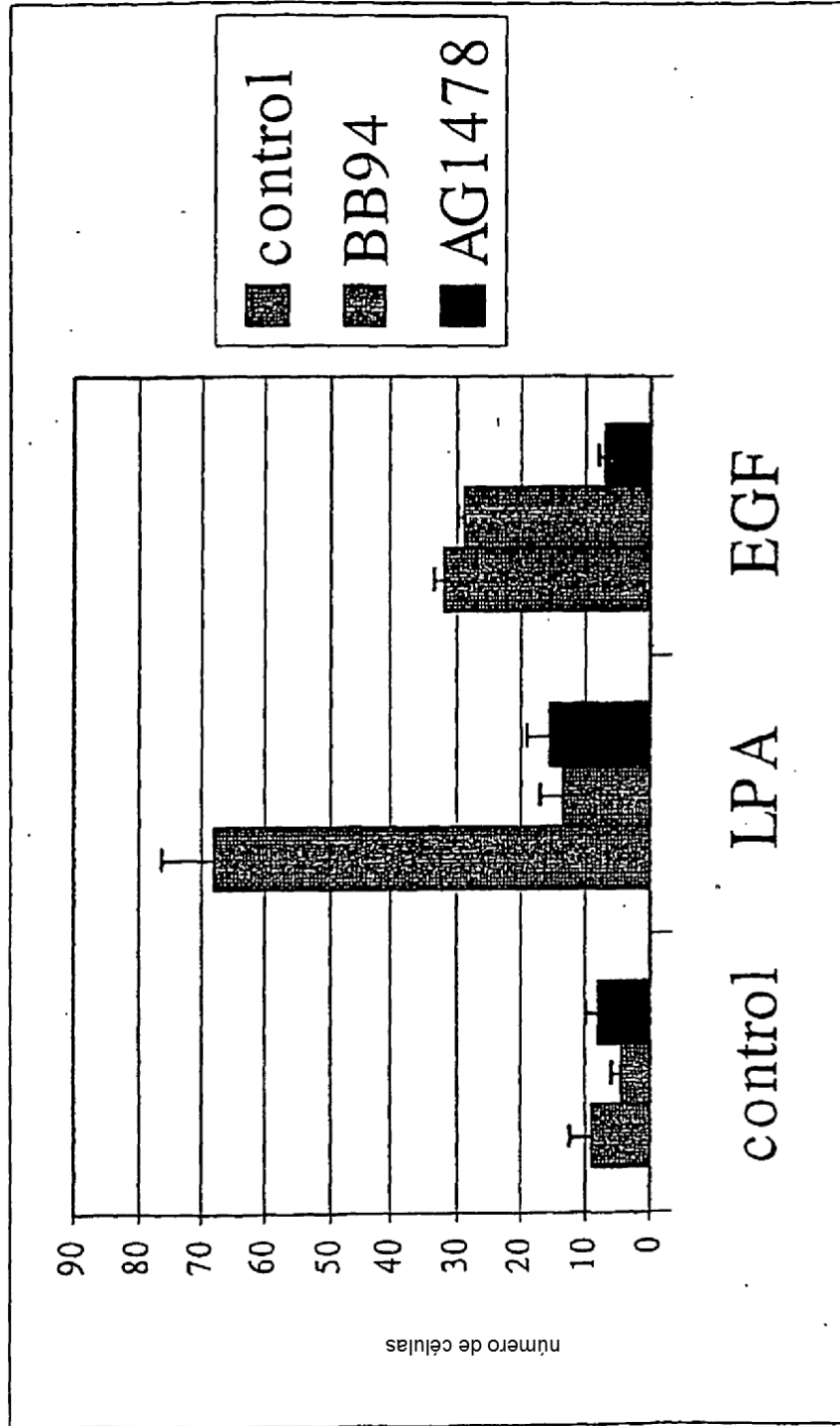


TABLA 1

Rastreo de líneas de células cancerígenas humanas en cuanto a la relevancia de la transactivación de EGFR

nombre	especie	origen	relevancia fisiológica				
			proliferación	migración	invasión	antiapoptosis	
Caki2	ser humano	riñones	no	sí	sí	no	
ACHN	ser humano	riñones	no	sí	sí	no	
HK2	ser humano	riñones	n/d	n/d	n/d	n/d	
A498	ser humano	riñones	no	sí	sí	no	
A704	ser humano	riñones	no	n/d	n/d	n/d	
SCABER	ser humano	vejiga	no	no	n/d	no	
HT1376	ser humano	vejiga	no	no	n/d	no	
TccSup	ser humano	vejiga	no	sí	sí	sí	
H292	ser humano	pulmones	sí	no	no	no	