

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 189**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05720394 .5**

96 Fecha de presentación: **09.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1726310**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **Fármaco para terapia contra el cáncer**

30 Prioridad:
19.03.2004 JP 2004080454

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2012

73 Titular/es:
**MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.
33-1, SHIBA 5-CHOME
MINATO-KU, TOKYO 108-8384, JP**

72 Inventor/es:
**HATAKE, Kiyohiko;
TERUI, Yasuhito;
MISHIMA, Yuji;
YAMADA, Akio;
SAKURAI, Takuma y
ITOH, Takehito**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

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).

ES 2 381 189 T3

DESCRIPCIÓN

Fármaco para terapia contra el cáncer

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con un fármaco (una composición farmacéutica) que contiene una mezcla de hidrolizado de lactoferrina, un péptido parcial de lactoferrina que se puede aislar de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina que se puede preparar mediante síntesis química o similares, que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, como un ingrediente activo. Más precisamente, la presente invención se relaciona con un fármaco que tiene una acción que mejora la sensibilidad a un fármaco de anticuerpos de células de cáncer que tienen resistencia al fármaco de anticuerpos.

Técnica Relacionada

El mecanismo para anticuerpos para reconocer un antígeno específico y eliminar las sustancias externas de los organismos que se han estudiado. Las preparaciones de inmunoglobulina se conocen bien como la aplicación de anticuerpos a tratamientos terapéuticos. Sin embargo, estos tienen problemas tales como título insuficiente y contaminación de fuentes de infección desconocidas.

La invención de la técnica de preparación de anticuerpos monoclonales por Milstein y Kohler introdujo avances en diversas técnicas de anticuerpos. Hoy en día, en el así llamado post-genoma, los genes específicos de células neoplásicas y factores patogénicos y la expresión de productos de los mismos se aclaran sucesivamente. Las técnicas de anticuerpos contribuyen en gran medida al desarrollo de métodos de investigación dirigidos a ellos y métodos terapéuticos obtenidos utilizándolos. Más aún, se espera fuertemente y llama la atención el avance adicional de las técnicas de anticuerpos en el futuro.

Los fármacos de anticuerpos que dirigen el tumor maligno han avanzado notablemente en el campo de la terapia molecular objetivo. Hasta ahora solo se han aprobado dos tipos de productos de fármaco de anticuerpos en Japón. Sin embargo, los fármacos de anticuerpos actualmente conocidos incluyen por lo menos aquellos contra el linfoma maligno (CD20, HLA-DR, CD5), leucemia mielógena aguda (CD33, CD66), leucemia linfocítica crónica (CD52, CD20), leucemia linfocítica aguda (CD19, CD20, CD22), mieloma múltiple (Idiotipo ID, HM1.24), cáncer de mama (HER2/neu), epiteloma (EGF-R, VEGF), cáncer de colon (17-1A, CEA), cáncer de ovario (CA125) y así sucesivamente (por ejemplo, refiérase al Documento de no Patente 1).

Como los mecanismos de acción de estos fármacos de anticuerpos contra tumores malignos se consideran alrededor de tres tipos de mecanismos. Es decir, los primeros son mecanismos en los que, cuando los anticuerpos se unen a una superficie de la célula de tumor maligno, ciertas señales se transmiten a la célula neoplásica para provocar muerte celular. Los segundos son mecanismos en los que las células efectoras (neutrófilos, macrófagos, células NK etc.) existentes en los organismos reconocen anticuerpos que unen las células neoplásicas mediante reacciones de antígeno-anticuerpo, y estos matan las células neoplásicas mediante la actividad citotóxica de los mismos. Los terceros son mecanismos en los que los componentes complemento en los organismos reconocen los anticuerpos que se unen a las células neoplásicas mediante reacciones de antígeno-anticuerpo, y estos inducen acción citotóxica mediante una ruta clásica entre las rutas de activación del sistema complemento para matar la célula neoplásica (por ejemplo, refiérase al Documento de No Patente 2).

Muchos pacientes con cáncer pueden haber sobrevivido mediante el desarrollo de fármacos de anticuerpos. Sin embargo, los informes han mostrado muchos casos en donde un tratamiento con un fármaco de anticuerpos ha llegado a ser difícil debido a las recurrencia de los tumores malignos que adquieren resistencia al fármaco de anticuerpos en el proceso de realizar los tratamientos. De acuerdo con lo anterior, se han examinado las terapias de combinación con agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, estos tienen problemas tales como restricción de tratamientos para evitar reacciones adversas (por ejemplo, refiérase al Documento No Patente 3).

Como un mecanismo de adquisición de resistencia a los fármacos de anticuerpos mediante células neoplásicas, se han reportado muchos casos en donde la expresión de las moléculas que se llama factores reguladores de complemento (CD46, CD55, CD59) aumenta en la superficie de las células neoplásicas. Estas inactivan la ruta clásica de los complementos en el tercer mecanismo de acción mencionado anteriormente, lo que conduce a la adquisición de la resistencia (por ejemplo, refiérase al Documento de No Patente 4). Se ha sugerido que la actividad citotóxica de los sistemas complemento se degradan mediante tal mecanismo, lo que resulta en la reducción de la sensibilidad de las células neoplásicas objetivo para los fármacos de anticuerpos. Así, se ha deseado el desarrollo de una técnica que mejora la actividad citotóxica del sistema complemento contra el tumor maligno que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos.

La lactoferrina es una glicoproteína de unión a hierro no hémica que existe en la leche, saliva, lágrimas, esperma, diversos tipos de moco etc. de mamíferos, y es una proteína multifuncional que tiene acción de adsorción de hierro, acción que promueve el crecimiento celular, acción inmunoreguladora y acción antimicrobiana. La lactoferrina bovina se puede obtener fácilmente en una gran cantidad de leche cruda desnatada o suero de queso manipulados rutinariamente en fabricas de lácteos y se pueden utilizar fácilmente como un producto comercial.

La lactoferricina (nombre comercial registrado del solicitante de la presente invención) es un péptido novedoso aislado del hidrolizado enzimático de lactoferrina bovina por primera vez por los inventores de la presente invención (por ejemplo, refiérase al Documento de Patente 1). La lactoferricina aislada de lactoferrina bovina tiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. La lactoferricina es una sustancia extremadamente útil que exhibe una acción antimicrobiana en una baja concentración en un amplio rango de microorganismos tales como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y levaduras que provocan diversas enfermedades en humanos y otros animales. La mayor parte de los agentes antimicrobianos clínicamente utilizados que incluyen antibióticos son sustancias químicas, que son extrañas para humanos y animales. Sin embargo, la lactoferricina es un péptido natural que no contiene ninguna sustancia química o derivado de aminoácido químicamente sintetizado, y por lo tanto es saludable y seguro para humanos y animales. Esto se debe a que la lactoferricina se produce en forma natural en el estómago humano mediante descomposición de la lactoferrina contenida en leche de vaca usualmente ingerida mediante pepsina gástrica. Por lo tanto, se puede utilizar lactoferricina como un agente antimicrobiano efectivo y seguro en una amplia variedad de productos comerciales tales como gotas para ojos, bucales, cosméticos, lociones para la piel, alimentos terapéuticos y productos para mascotas, y así tiene un valor extremadamente grande.

Con relación al efecto antineoplásico de lactoferrina, se han descrito un fármaco antineoplásico (Documento de Patente 2), fármaco antineoplásico (Documento de Patente 3), inhibidor de metástasis de cáncer que se administra oralmente (Documento de Patente 4) y así sucesivamente. Estas técnicas utilizan el efecto de la lactoferrina que actúa directamente en las células neoplásicas, y los efectos son diferentes del efecto antineoplásico que se puede atribuir para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpo, que llama atención en la reciente terapia contra el cáncer. Es decir, se ha desconocido que una mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina tienen un efecto para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, en particular, terapia de anticuerpos contra el cáncer resistente a fármacos.

[Documento de Patente 1] Patente Japonesa No. 2818056

[Documento de Patente 2] Patente Japonesa Expuesta (Kokai) No. 63-51337

[Documento de Patente 3] Patente Japonesa Expuesta No. 7-309771

[Documento de Patente 4] Patente Japonesa Expuesta No. 10-59864

[Documento de No Patente 1] Ogura M., Saishin Igaku, Vol. 58, No.12, pp.102-121, 2003

[Documento de No Patente 2] Koyasu S. ed., Kinoshita T., Current Immunology Illustrated, pp.41-43, 2003

[Documento de No Patente 3] Hatake K., Blood Frontier, Vol. 12, No.11, pp.65-71, 2002

[Documento de No Patente 4] Oncogene, Vol. 22, pp.7359-7368, 2003

La US 5,656,591 y WO 98/06424 ambas a nombre de Morinaga Milk Industry Co., Ltd. se relacionan con composiciones que contienen derivados de lactoferrina. La US 5,656,591 describe agentes antimicrobianos que contienen péptidos antimicrobianos derivados de lactoferrina y la WO 98/06424 describe inhibidores de metástasis cancerosa que ofrecen efectos colaterales reducidos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco altamente seguro que no provoca reacción adversa y tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de los fármacos de anticuerpos en las terapias de anticuerpo de cáncer, en particular, cáncer resistente a fármacos, el alimento o bebida que contiene el fármaco y un método para mejorar la actividad citotóxica de los fármacos de anticuerpos.

Mientras se presta atención a las técnicas para mejorar más efectivamente la actividad citotóxica de los fármacos de anticuerpos que conducen a resultados de mejora del tratamiento, los inventores de la presente invención consideran que, si podemos mejorar la sensibilidad de las células neoplásicas objetivo al fármaco de anticuerpos, se debe exhibir suficiente actividad citotóxica del sistema complemento aún si se confirma resistencia al fármaco de anticuerpos en un paciente con el tumor maligno, y se realiza asiduamente investigación y desarrollo. Como resultado, encontramos que una mezcla de hidrolizado de lactoferrina y un péptido que se puede aislar de la mezcla

de hidrolizado de lactoferrina actúa en células neoplásicas objetivo para mejorar la sensibilidad de las células a un fármaco de anticuerpos en un sistema experimental en donde se provoca un efecto citotóxico por el anticuerpo y el complemento, logrando así la presente invención.

Es decir, la presente invención se relaciona con un fármaco novedoso que contiene una mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina aislado de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina que se puede preparar mediante síntesis química o similares como un ingrediente activo basado en la acción que mejora la actividad citotóxica de los fármacos de anticuerpos, que es esencialmente diferente del efecto antineoplásico de la lactoferrina conocido convencionalmente, en la terapia de anticuerpos se considera que es particularmente efectiva contra el cáncer para la que casi no se han encontrado hasta ahora terapias o fármacos efectivos y, usos de los mismos.

La primera invención de la presente invención que logra el objeto mencionado anteriormente se define en la reivindicación 1. La composición es para uso en mejorar la actividad citotóxica de los fármacos de anticuerpos en las terapias de anticuerpos contra el cáncer. Se puede obtener hidrolizado de lactoferrina al hidrolizar la lactoferrina con una enzima hidrolítica y tener una acción que mejora la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer como un ingrediente activo.

La primera invención mencionada anteriormente se puede caracterizar por las reivindicaciones 2 a 11 como realizaciones preferidas. En algunos ejemplos:

1) La enzima hidrolítica mencionada anteriormente es pepsina.

2) El índice de degradación del hidrolizado de lactoferrina mencionado anteriormente es 6 a 20%.

3) El hidrolizado de lactoferrina mencionado anteriormente tiene un número de peso molecular promedio de 500 a 5000.

4) El cáncer mencionado anteriormente es uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B y cáncer de colon.

5) El cáncer mencionado anteriormente es un cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos.

6) La acción mencionada anteriormente para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos es una acción para aumentar la sensibilidad de células neoplásicas objetivo al fármaco de anticuerpos.

Otra realización de la primera invención mencionada anteriormente se utiliza de la composición mencionada anteriormente como se define en la reivindicación 13 para la producción del fármaco mencionado anteriormente. Adicionalmente, se describe un método para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer utilizando el fármaco de anticuerpos, en donde el hidrolizado de lactoferrina mencionado anteriormente se administra a un paciente.

Adicionalmente se describe un fármaco para la mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, que comprende cualquier un tipo o una mezcla de dos o más tipos de los siguientes péptidos de (a) a (d) como un ingrediente activo:

(a) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(b) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 60 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que incluye sustitución, eliminación, adición o inversión de uno o más residuos de aminoácidos, y que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer;

(c) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

(d) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 61 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que incluye sustitución, eliminación, adición o inversión de uno o más residuos de aminoácidos, y que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer.

El fármaco mencionado anteriormente se puede caracterizar por los siguientes 7) a 9) como ejemplos preferidos.

7) El cáncer mencionado anteriormente es uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B y cáncer de colon.

8) El cáncer mencionado anteriormente es un cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos.

9) La acción mencionada anteriormente para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos es una acción para aumentar la sensibilidad de células neoplásicas objetivo al fármaco de anticuerpos.

Otra realización del fármaco mencionado anteriormente se utiliza del péptido mencionado anteriormente para la producción del fármaco mencionado anteriormente. Adicionalmente, otra realización del fármaco mencionado anteriormente es un método para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer utilizando el fármaco de anticuerpos mencionado anteriormente, en donde se administra a un paciente el hidrolizado de lactoferrina mencionado anteriormente.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el alimento o bebida que comprende la composición, como se define en la reivindicación 12.

Se describe el alimento o bebida que comprende un hidrolizado de lactoferrina que se puede obtener al hidrolizar lactoferrina con una enzima hidrolítica y tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, que se une con una indicación que el alimento o bebida se utiliza para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para una terapia de anticuerpos contra el cáncer.

Adicionalmente se describe un fármaco para una terapia de anticuerpos contra el cáncer, que comprende un hidrolizado de lactoferrina que se puede obtener al hidrolizar lactoferrina con una enzima hidrolítica y un fármaco de anticuerpos como ingredientes activos.

El fármaco mencionado anteriormente se puede caracterizar por los siguientes 10) a 14) como ejemplos preferidos.

10) La enzima hidrolítica mencionada anteriormente es pepsina.

11) El índice de degradación del hidrolizado de lactoferrina mencionado anteriormente es 6 a 20 %.

12) El hidrolizado de lactoferrina mencionado anteriormente tiene un número de peso molecular promedio de 500 a 5000.

13) El fármaco de anticuerpos mencionado anteriormente es un anticuerpo anti-CD20, anticuerpo monoclonal anti-HER2 o anticuerpo anti-17-1A (factor de adhesión de célula epitelial relacionada con tumor humano).

14) El cáncer mencionado anteriormente es un cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos.

Adicionalmente se describe un fármaco para una terapia de anticuerpos contra el cáncer, que comprende cualquier un tipo o una mezcla de dos o más tipos de los siguientes péptidos de (a) a (d) y un fármaco de anticuerpos como ingredientes activos:

(a) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(b) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 60 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que incluye sustitución, eliminación, adición o inversión de uno o más residuos de aminoácidos, y que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer;

(c) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

(d) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 61 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que incluye sustitución, eliminación, adición o inversión de uno o más residuos de aminoácidos, y que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer.

El fármaco mencionado anteriormente se puede caracterizar por los siguientes 15) y 16) como ejemplos preferidos.

15) El fármaco de anticuerpos mencionado anteriormente es un anticuerpo anti-CD20, anticuerpo monoclonal anti-HER2 o anticuerpo anti-17-1A (factor de adhesión de célula epitelial relacionada con tumor humano).

16) El cáncer mencionado anteriormente es un cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos.

La presente invención conduce a un fármaco para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, que comprende una mezcla de hidrolizado de lactoferrina, un péptido parcial de lactoferrina que se puede aislar de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina que se puede preparar mediante síntesis química o similares como un ingrediente activo, y las células

neoplásicas objetivo se pueden matar o lesionar eficientemente al mejorar la actividad citotóxica de complemento y el fármaco de anticuerpos.

Adicionalmente, el fármaco también tiene un efecto de recuperación de la actividad citotóxica de complemento y el fármaco de anticuerpos, en particular, contra células neoplásicas que tienen resistencia al fármaco de anticuerpos. Adicionalmente, el ingrediente activo del fármaco para tratamiento terapéutico del cáncer que tiene resistencia se puede obtener a partir de una materia prima relativamente económica tal como leche de vaca y por lo tanto producida a gran escala.

Adicionalmente, el ingrediente activo mencionado anteriormente también ejerce el mismo efecto que aquel del fármaco mencionado anteriormente cuando está contenido en el alimento o bebida, que se une con una indicación que el alimento o bebida es para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura 1 muestra el efecto de una mezcla de hidrolizado de lactoferrina y un péptido parcial de lactoferrina de la presente invención en la actividad citotóxica de rituximab contra células Raji. El símbolo "*" denota $t < 0.001$ con relación al Medio (caldo de cultivo).

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

Aquí adelante, se explicarán en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a las realizaciones preferidas descritas adelante y se puede modificar libremente dentro del alcance de las reivindicaciones. En la presente especificación, se utiliza el porcentaje con base en masa a menos que se indique otra cosa.

El ingrediente activo del fármaco para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer o el fármaco para una terapia de anticuerpos contra el cáncer de la presente invención (también denominado en adelante simplemente como "el fármaco") es un hidrolizado de lactoferrina que se puede obtener al hidrolizar lactoferrina con una enzima hidrolítica y tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer (en adelante también denominado como "mezcla de hidrolizado de lactoferrina") o cualquier tipo o mezcla de dos o más tipos de los siguientes péptidos de (a) a (d) (aquí adelante, también denominado como "péptido parcial de lactoferrina"):

(a) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(b) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 60 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que incluye sustitución, eliminación, adición o inversión de uno o más residuos de aminoácidos, y que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer;

(c) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

(d) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 61 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que incluye sustitución, eliminación, adición o inversión de uno o más residuos de aminoácidos, y que tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer.

La SEQ ID NO: 2 corresponde a los números de aminoácidos 36 a 60 en la SEQ ID NO: 1. Adicionalmente, la SEQ ID NO: 3 corresponde a los números de aminoácidos 36 a 61 en la SEQ ID NO: 1.

En la presente invención, el término "fármaco de anticuerpos utilizado para una terapia de anticuerpos contra el cáncer" significa un fármaco que contiene un anticuerpo unido a una superficie de una célula de cáncer como un ingrediente activo y mata o lesiona la célula de cáncer mediante la unión del anticuerpo mencionado anteriormente a la célula de cáncer. Las acciones del fármaco de anticuerpos incluyen la inhibición de una señal de crecimiento de célula de cáncer, matando o lesionando células de cáncer al activar una señal de muerte celular, matando o lesionando las células de cáncer mediante citotoxicidad dependiente de complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, y así sucesivamente.

En la presente invención, la expresión "mejora la actividad citotóxica" abarca, además de un efecto para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, es decir, mejorar una acción de un complemento y/o un fármaco de anticuerpos para matar o lesionar las células neoplásicas objetivo, una acción para aumentar la sensibilidad a un fármaco de anticuerpos de células neoplásicas que tienen resistencia al fármaco de anticuerpos, es decir, recuperar la actividad citotóxica del complemento y/o el fármaco de anticuerpos. Adicionalmente, la expresión "que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpo" significa que tiene resistencia a una

acción de un fármaco de anticuerpos o complemento para mejorar o lesionar las células neoplásicas (actividad citotóxica). En otras palabras, significa que la acción mencionada anteriormente puede ser débil, o las células neoplásicas no incurrir en la acción. Adicionalmente, la resistencia a un fármaco de anticuerpos no se limita a la resistencia provocada por un factor regulador de complemento, e incluye resistencia a un fármaco de anticuerpos provocada por otros factores.

Una mezcla de hidrolizado de lactoferrina y un péptido parcial de lactoferrina que se puede aislar de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina (péptido parcial de lactoferrina), el ingrediente activo del fármaco de la presente invención, se puede preparar al utilizar lactoferrina como un material de partida. Como lactoferrina, se pueden utilizar lactoferrinas comercialmente disponibles y las lactoferrinas obtenidas de calostro, leche de transición, leche natural o leche de lactancia tardía de mamíferos (por ejemplo, humano, bovino y así sucesivamente) o productos procesados de estas leches tal como leche descremada y suero como materia prima mediante aislamiento de las materias primas mencionadas anteriormente con una técnica convencional tal como cromatografía de intercambio iónico. En particular, se puede utilizar preferiblemente la lactoferrina comercialmente disponible producida en una escala industrial (por ejemplo, una producida por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.). Adicionalmente, también se pueden utilizar lactoferrinas producidas con microorganismos, células de animal, animales transgénicos y así sucesivamente al utilizar técnicas de ingeniería.

Adicionalmente, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar a aquella de un péptido que se puede aislar de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina (péptido parcial de lactoferrina) también se puede preparar mediante síntesis química, técnicas de ingeniería genética o similares.

Ejemplos del método para preparar una mezcla de hidrolizado de lactoferrina, el ingrediente activo del fármaco, al utilizar tal lactoferrina incluyen un método para hidrolizar lactoferrina con una enzima hidrolítica o similares en una forma convencional. Para el método específico, la enzima utilizada para la hidrólisis de lactoferrina puede ser cualquier enzima hidrolítica siempre que sea una enzima que descompone la lactoferrina para producir péptidos que tienen una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer o una mezcla del mismo.

Ejemplos de la enzima hidrolítica incluyen pepsina, pancreatina, tripsina, quimiotripsina, proteasas derivadas de *Aspergillus oryzae* o *Streptomyces griseus* y así sucesivamente. Se puede utilizar uno o más tipos de enzimas hidrolíticas. Cuando se utilizan dos o más tipos de enzimas, las reacciones enzimáticas se pueden realizar simultáneamente o separadamente. En la presente invención, se utiliza preferiblemente particularmente pepsina. Adicionalmente, también es posible utilizar una proteasa del tipo endo en combinación con una enzima hidrolítica tipo exo. El tiempo de reacción de hidrólisis se determina preferiblemente de tal manera que se puede obtener el índice de degradación preferido mientras se supervisa el índice de degradación de la reacción enzimática. Para obtener una mezcla de hidrolizado de lactoferrina, el ingrediente activo del fármaco, el índice de degradación es preferiblemente 6 a 20 %, particularmente preferiblemente 8 a 12 %.

El índice de degradación de una proteína se puede calcular, por ejemplo, al medir el contenido de nitrógeno total de una muestra por el método Kjeldahl (Ed. by The Japanese Society for Food Science and Technology, "Food Analysis Methods," p.102, Korin, 1984), que mide el contenido de nitrógeno formol de la muestra mediante el método de titulación de formol (Ed. by Mitsuda et al., "Laboratory Manual of Food Engineering," First Volume, p. 547, Yokendo Co., Ltd., 1970) y utilizando estos valores medidos en la siguiente ecuación.

$$\text{Índice de degradación (\%)} = (\text{Contenido de nitrógeno formol} / \text{Contenido de nitrógeno total}) \times 100$$

Cuando se obtiene un índice de degradación preferido, se puede terminar la reacción enzimática. La reacción enzimática se puede terminar mediante la inactivación de la enzima en la solución de hidrólisis, que se puede llevar a cabo mediante tratamiento de inactivación por calor en una forma convencional. La temperatura de calentamiento y el tiempo de retención del tratamiento de inactivación por calor se puede seleccionar en forma adecuada como condiciones que permite la inactivación suficiente que tiene en cuenta la estabilidad térmica de la enzima utilizada, y, por ejemplo, se puede realizar la inactivación en el rango de temperatura de 80 a 130° C para un tiempo de retención de 30 minutos a 2 segundos. La mezcla de reacción obtenida se ajusta preferiblemente para estar dentro del rango de pH de 5.5 a 7 con un ácido tal como ácido cítrico. Cuando la mezcla de hidrolizado de lactoferrina contiene sustancias insolubles, estas se pueden retirar mediante centrifugación o filtración.

En la presente invención, el número de peso molecular promedio de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina es preferiblemente 500 a 5000, particularmente preferiblemente 1000 a 4000.

Como se describe en, por ejemplo, la literatura (The Society of Polymer Science, Japan, ed., "Fundamentals of Polymer Science", pp.116-119, Tokyo Kagaku Dozin Co., Ltd., 1978), el número de peso molecular promedio representa un peso molecular promedio de un compuesto macromolecular sobre la base de diferentes índices como se describe adelante.

Es decir, un compuesto macromolecular tal como hidrolizado de proteína es una sustancia heterogénea, y los pesos moleculares de las moléculas individuales tienen una distribución. Por lo tanto, el peso molecular de un hidrolizado de proteína necesita ser representado por un peso molecular promedio para dirigirlo fisicoquímicamente. El número de peso molecular promedio (en adelante también se abrevia como Mn) es un promedio con respecto al número de moléculas. Cuando el peso molecular de una cadena de péptido i es Mi, y el número de moléculas de la misma es Ni, Mn se define por la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$Mn = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} Mi Ni}{\sum_{i=1}^{\infty} Ni}$$

La mezcla de hidrolizado de lactoferrina obtenida como se describió anteriormente se puede utilizar como un ingrediente activo del fármaco como está, o se puede liofilizar o se seca por rociado en una forma convencional y se almacena como polvo. Adicionalmente, también se puede utilizar para la producción de un péptido parcial de lactoferrina, otro ingrediente activo del fármaco. Adicionalmente, la mezcla de hidrolizado de lactoferrina se puede obtener al agregar un péptido parcial de lactoferrina a un producto de hidrólisis de lactoferrina obtenido como anteriormente.

Ejemplos específicos del péptido parcial de lactoferrina mencionado anteriormente incluyen un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 60 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 mostrada en el Listado de Secuencias y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 61 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 mostrada en el Listado de Secuencias (SEQ ID NO: 2). Aquí adelante, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 60 (SEQ ID NO: 3) también se denomina como lactoferrina F₃₆-F₆₀, y el péptido mencionado anteriormente que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 61 también se denomina como lactoferrina F₃₆-A₆₁.

Cuando los péptidos que comprende la lactoferrina F₃₆-F₆₀ y lactoferrina F₃₆-A₆₁ se utilizan como los ingredientes activos, la relación de mezcla de la lactoferrina F₃₆-F₆₀ y lactoferrina F₃₆-A₆₁ es preferiblemente 1:20 a 20:1 (lactoferrina F₃₆-F₆₀:lactoferrina F₃₆-A₆₁), particularmente preferiblemente 1:10 a 2:3 (lactoferrina F₃₆-F₆₀:lactoferrina F₃₆-A₆₁).

El péptido parcial de lactoferrina, específicamente la lactoferrina F₃₆-F₆₀ y/o lactoferrina F₃₆-A₆₁, se puede preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método para producir lactoferrina descrito en la Patente Japonesa Expuesta (Kokai) No. 5-238948 al utilizar una mezcla de hidrolizado de lactoferrina preparada como se describió anteriormente como un material de partida. Adicionalmente, la lactoferrina F₃₆-F₆₀ y/o lactoferrina F₃₆-A₆₁ puede ser cualquier péptido preparado por un método para producir un péptido sintético mediante síntesis química, un péptido producido por un método para producirlo mediante la síntesis de un péptido recombinante utilizando una técnica de ingeniería genética utilizando una técnica de recombinación de gen etc. y así sucesivamente, siempre que sea un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 36 a 60 y/o los números de aminoácidos 36 a 61 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, para el método de utilizar una técnica de ingeniería genética, se puede obtener el péptido parcial de lactoferrina al preparar los cebadores adecuados sobre la base de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que incluye una región de interés, amplificando la secuencia de nucleótidos mediante PCR utilizando los cebadores mencionados anteriormente y cADN que incluye la secuencia de nucleótidos objetivo como una plantilla y que expresa la secuencia de nucleótidos obtenida utilizando un sistema de expresión adecuado.

Adicionalmente, los genes usuales pueden contener una mutación tal como sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de uno o más nucleótidos en una o más posiciones debido a la diferencia en las especies, géneros, individuos y así sucesivamente, y residuos de aminoácidos de una proteína codificada por un gen que tiene tal mutación también puede tener una mutación. La lactoferrina F₃₆-F₆₀ y lactoferrina F₃₆-A₆₁ que se puede utilizar para la presente invención que incluye tal mutación también puede caer dentro del alcance de la presente invención siempre que la acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer que tiene resistencia no se degrade. El número de residuos de aminoácidos sustituidos, eliminados, insertados, agregados o invertidos que se pueden incluir en la lactoferrina F₃₆-F₆₀ o lactoferrina F₃₆-A₆₁ es preferiblemente 1 a 12, más preferiblemente 1 a 8, más preferiblemente 1 a 5. Adicionalmente, la sustitución de los residuos de aminoácidos es preferiblemente la sustitución de aminoácidos que tienen propiedad similar, es decir, la así llamada sustitución conservadora. Si tal lactoferrina F₃₆-F₆₀ o lactoferrina F₃₆-A₆₁ modificada es mayor que la lactoferrina F₃₆-F₆₀ o lactoferrina F₃₆-A₆₁, los aminoácidos agregados son preferiblemente los aminoácidos correspondientes a una secuencia en el lado del terminal N desde la posición 36 o en el lado del terminal C desde la posición 60 o 61 de la lactoferrina. Sin embargo, siempre que la lactoferrina F₃₆-F₆₀ o lactoferrina F₃₆-A₆₁ modificada mencionada anteriormente tenga una acción deseada, las secuencias de aminoácido agregadas pueden ser los aminoácidos arbitrarios.

La mezcla de hidrolizado de lactoferrina o péptido parcial de lactoferrina que se puede utilizar para la presente invención tiene una acción que mejora la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, y se puede medir la acción de acuerdo con un método utilizando yoduro de propidio (PI, Dojindo, catálogo No. P378) [Cytometry, Vol. 8, No. 4, pp. 421-426, 1987] o un método utilizando calceína-AM (Dojindo, catálogo No. 341-07901) [Apoptosis, Vol. 3, No. 3, pp.195-202, 1998]. En los ejemplos descritos adelante, el método de medición se explicará en detalle.

Como el fármaco, una mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina se puede administrar oralmente o parenteralmente a un mamífero que incluye humano en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable para preparaciones farmacéuticas. Como el fármaco para una terapia de anticuerpos contra el cáncer, un fármaco de anticuerpos se utiliza adicionalmente en combinación con los componentes mencionados anteriormente. La forma de dosificación del fármaco no se limita particularmente, y se puede seleccionar en forma adecuada dependiente del propósito de tratamiento terapéutico. Ejemplos específicos del mismo incluyen comprimidos, píldoras, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas, jarabes, supositorios, inyecciones, ungüentos, parches, gotas para ojos, gotas nasales y así sucesivamente. En la producción de la preparación farmacéutica, se pueden utilizar los aditivos comúnmente utilizados para agentes usuales como portadores farmacéuticos tales como excipientes, aglutinantes, agentes desintegrantes, lubricantes, estabilizantes, agentes saborizantes, diluyentes, tensoactivos y solventes para inyección.

La cantidad de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina o péptido parcial de lactoferrina contenido en el fármaco de la presente invención no se limita particularmente y se puede seleccionar en forma adecuada. Sin embargo, por ejemplo, la concentración de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina contenida en la preparación farmacéutica puede ser 10 µg/ml a 50 mg/ml, preferiblemente 50 µg/ml a 10 mg/ml, y la concentración de péptido parcial de lactoferrina en la preparación puede ser 0.5 a 200 µg/ml, preferiblemente 1 a 100 µg/ml.

El tiempo de administración del fármaco no se limita particularmente, y se puede administrar antes o después de la administración de un fármaco de anticuerpos o simultáneamente con un fármaco de anticuerpos. El tiempo de administración se puede seleccionar en forma adecuada de acuerdo con el método de tratamiento terapéutico para el tipo de cáncer objetivo. El método de administración se selecciona en forma adecuada también dependiendo de la forma de dosificación, edad, sexo y otras afecciones de los pacientes, severidad de los síntomas de los pacientes y así sucesivamente.

La dosis del ingrediente activo contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se selecciona de forma adecuada dependiendo del método de administración, edad, sexo y severidad de la enfermedad de los pacientes, otras afecciones y así sucesivamente. La dosis de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina o péptido parcial de lactoferrina como el ingrediente activo está preferiblemente en el rango de 0.001 a 60 mg/kg/día, preferiblemente 0.01 a 20 mg/kg/día, como una directriz, y la dosis se puede dar una vez al día o en dos o más veces al día como porciones divididas.

El fármaco es útil como un fármaco curativo, un fármaco que mejora el efecto curativo o un fármaco curativo auxiliar en un tratamiento terapéutico utilizando un fármaco de anticuerpos para un cáncer, por ejemplo, uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B y cáncer de colon. Más aún, entre los fármacos, el fármaco que comprende un fármaco de anticuerpos junto con una mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina se puede utilizar como un fármaco para terapia de anticuerpos contra el cáncer. Adicionalmente, aún cuando se utiliza el fármaco para terapia de anticuerpos contra el cáncer, también se puede administrar adicionalmente un fármaco de anticuerpos o el fármaco para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos. Los fármacos exhiben eficacia extremadamente marcada contra, en particular, el cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos entre los cánceres mencionados anteriormente. Ejemplos del fármaco de anticuerpos que se puede utilizar para la presente invención incluyen un anticuerpo anti-CD20 (rituximab), anticuerpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumab), anticuerpo anti-17-1A (moléculas de adhesión de epiteloma humano) (edrecolomab) y así sucesivamente. Adicionalmente, también se pueden utilizar fármacos de anticuerpos que se pueden utilizar en terapia de anticuerpos para terapia contra el cáncer. Más aún, no solo se pueden utilizar los fármacos de anticuerpos actualmente conocidos, sino también los fármacos de anticuerpos que se desarrollarán en el futuro.

Los fármacos se utilizan preferiblemente en terapia de anticuerpos junto con un fármaco de anticuerpos (este no se limita si se administran simultáneamente o se administran separadamente), y también es posible utilizarlos junto con un fármaco terapéutico o profiláctico conocido (que incluye un fármaco mejorado y fármaco auxiliar) para cualquiera de los cánceres mencionados anteriormente en combinación. El uso combinado puede mejorar el efecto profiláctico y terapéutico para las enfermedades de los cánceres mencionados anteriormente, y también puede reducir el fármaco profiláctico o terapéutico mencionado anteriormente utilizado en combinación. Adicionalmente, el fármaco profiláctico o terapéutico para los cánceres mencionados anteriormente que se va a utilizar en combinación puede estar contenido en las composiciones de los fármacos de la presente invención como un ingrediente activo, o no puede estar contenido en las composiciones de los fármacos de la presente invención, pero se combina como un fármaco separado para constituir un producto comercial y se combina luego de uso.

El fármaco o la mezcla de hidrolizado de lactoferrina o péptido parcial de lactoferrina como ingrediente activo del fármaco puede estar contenido en el alimento o bebida. La forma y propiedad del alimento o bebida no se limitan particularmente siempre que el efecto del ingrediente activo no se degrade, y el alimento o bebida se puede ingerir oralmente, y se pueden producir en una forma convencional al utilizar materias primas usualmente utilizadas para el alimento o bebida excepto que se agrega el ingrediente activo mencionado anteriormente.

El uso del alimento o bebida de la presente invención puede ser cualquiera de diversos usos para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer. Ejemplos incluyen, por ejemplo, uso como el alimento o bebida útil para reducción o eliminación de un factor de riesgo de cáncer, en particular, cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos.

El alimento o bebida de la presente invención también es útil para la prevención de una enfermedad provocada por un cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos y así sucesivamente.

Adicionalmente, el alimento o bebida de la presente invención puede evitar diversas enfermedades, complicaciones de las mismas y así sucesivamente que resultan de un cáncer que tiene resistencia a un fármaco de anticuerpos y reducir el riesgo de estas enfermedades, complicaciones de las mismas y así sucesivamente.

El alimento o bebida de la presente invención se vende preferiblemente como el alimento o bebida junto a una indicación "Para uso para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", por ejemplo, "el alimento o bebida que contiene un fármaco para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer indicada como "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer" o "el alimento o bebida que contiene una mezcla de hidrolizado de lactoferrina o un péptido parcial de lactoferrina indicado como "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", o "el alimento o bebida que contiene un compuesto que tiene un efecto para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", o "el alimento o bebida que contiene un hidrolizado de lactoferrina indicado como "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", "el alimento o bebida que contiene un péptido parcial de lactoferrina indicado como "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", "el alimento o bebida que contiene un péptido parcial de lactoferrina indicado como "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", o similares. Adicionalmente, debido a que los compuestos, composiciones y así sucesivamente de la presente invención tienen una acción para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer, el alimento o bebida de la presente invención se puede indicar como "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer".

La frase para tal indicación como se describió anteriormente no se limita necesariamente por la expresión "Para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer", y cualquier frase que expresa un efecto auxiliar o para mejorar el efecto para la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer por supuesto cae dentro del alcance de la presente invención. Como tal una frase, también es posible una indicación con base en diversos usos que les permite a los consumidores reconocer mejorar el efecto para la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer o un efecto auxiliar o mejorado para un fármaco de anticuerpos utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer. Ejemplos incluyen, por ejemplo, una indicación "Útil para la reducción y eliminación de los factores de riesgo de cáncer que tienen resistencia a un fármaco de anticuerpos etc." Adicionalmente, en la indicación mencionada anteriormente, se puede omitir la frase de "utilizado para terapia de anticuerpos contra el cáncer".

El término "indicación" mencionado anteriormente incluye todas las acciones para informar a los consumidores del uso mencionado anteriormente, y cualesquier indicaciones que recuerden o hagan analogía al uso mencionado anteriormente caen dentro del alcance de la "indicación" de la presente invención independientemente del propósito, contenido, artículo objetivo, medio etc. de la indicación. Sin embargo, la indicación se hace preferiblemente con una expresión que permite a los consumidores reconocer directamente el uso mencionado anteriormente. Ejemplos específicos incluyen las acciones que indican el uso mencionado anteriormente en productos o paquetes de productos que se relacionan con el alimento o bebida de la presente invención, las acciones de asignar, suministrar, exhibir para el propósito de asignar o suministrar o importar tales productos o paquetes de productos indicados con el uso mencionado anteriormente, que exhiban o distribuyan avisos publicitarios, listas de precios o documentos comerciales que se relacionan con los productos, o proporcionan información que incluye aquella con contenidos con el uso mencionado anteriormente indicado por un método electromagnético (Internet etc.) y así sucesivamente.

La indicación es preferiblemente una indicación aprobada por la administración etc. (por ejemplo, una indicación en una forma con base en una aprobación, que se cualifica sobre la base de cualquiera de los diversos sistemas legales proporcionados por la administración), y es particularmente preferiblemente una indicación en paquetes, contenedores, catálogos, panfletos y materiales de anuncios publicitarios en puntos de venta tal como POP, otros documentos y así sucesivamente.

Ejemplos de la indicación incluyen adicionalmente, por ejemplo, indicaciones como alimento saludable, alimento funcional, alimento nutritivo entérico, alimento para usos dietarios especiales, alimento con declaración de función de nutrientes, cuasi-fármaco y así sucesivamente así como también las indicaciones aprobadas por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, por ejemplo, las indicaciones aprobadas sobre la base del sistema de alimento para usos saludables especificados y sistemas similares. Ejemplos de los últimos incluyen las indicaciones como alimento para usos saludables especificados, las indicaciones como alimentos para usos saludables especificados con declaraciones sobre salud calificadas, indicaciones de influencias en las estructuras y funciones corporales, indicaciones de reducción de reclamos de riesgo de enfermedad y así sucesivamente, y más precisamente, ejemplos típicos incluyen indicaciones como usos saludables especificados (especialmente indicaciones de uso para la salud) previstas en la aplicación de las regulaciones de la Ley de Promoción de la Salud (Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, Ordenanza Ministerial No. 86, abril 30, 2003) e indicaciones similares.

Ejemplos

Aquí adelante, la presente invención se explicará específicamente adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

[Ejemplo de Preparación 1]

Preparación de mezcla de hidrolizado de lactoferrina

La lactoferrina bovina aislada de leche descremada (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., pureza: aproximadamente 90%) en una cantidad de 2.0 kg se disuelve en agua destilada en una concentración de 5 % de masa, y la solución se ajusta a pH 3.0 mediante la adición de 1 N ácido clorhídrico. La pepsina cristalina (Difco) se agrega en una relación de 3 % de masa del sustrato, y se permite hidrólisis a 37° C durante 4 horas. Luego, la mezcla de reacción se calienta a 80°C durante 15 minutos para inactivar la pepsina, y se agrega 1 N hidróxido de sodio para ajustar la mezcla de reacción a pH 7.0. Las sustancias insolubles se retiran mediante filtración, y el filtrado se seca por rociado para preparar aproximadamente 1.9 kg de hidrolizado de lactoferrina en polvo. El índice de descomposición de la mezcla producida de hidrolizado de lactoferrina es 10 %.

[Ejemplo de Preparación 2]

Preparación del péptido hidrolizado de lactoferrina

Un material de partida preparado en la misma forma como en el Ejemplo de Preparación 1 (mezcla de hidrolizado de lactoferrina) en una cantidad de 600 g se disuelve en agua destilada en una concentración de 5 % de masa. Se equilibra aproximadamente 3000 ml de un portador hidrófobo (Butil TOYOPERL 650 M, nombre comercial, TOSOH CORP.) mediante lavado suficiente con agua. La solución del material de partida se mezcla con el portador hidrófobo en un tanque proporcionado por un agitador, y luego se separa la solución. El portador hidrófobo se llena en una columna (10 cm de longitud y 20 cm de diámetro), y la solución separada mencionada anteriormente se carga en la columna. Luego, la columna se lava suficientemente al utilizar agua en un índice de flujo de 400 ml/minuto hasta que la absorbancia de la solución de lavado a 280 nm llega a ser 0.06 o menos.

Posteriormente, 10 mmol de ácido clorhídrico se carga en la columna para eluir el péptido hidrolizado de lactoferrina, el eluato se mezcla con un volumen igual de regulador Mcllvaine (mezcla de 177 partes por volumen de 0.1 M ácido acético + 823 partes por volumen de 0.2 M fosfato primario de sodio, pH 7.0) y los péptidos se adsorben en el portador hidrófobo. El portador hidrófobo se llena en una columna y se lava con 6000 ml del mismo regulador, y el péptido hidrolizado de lactoferrina se eluye con 9000 ml de regulador Mcllvaine (mezcla de 485 partes por volumen de 0.1 M ácido acético + 515 partes por volumen de 0.2 M fosfato primario de sodio, pH 5.0). Se carga 10 mM ácido clorhídrico y agua en la columna para regenerar el portador hidrófobo, y pH del eluato se ajusta a 7.0 con 1 N solución de hidróxido de sodio. El eluato mencionado anteriormente que contiene el péptido hidrolizado de lactoferrina se pasa a través de esta columna, y la columna se lava con 30 l de agua para retirar las sales del regulador. Luego, se carga 10 mM ácido clorhídrico en la columna para eluir el péptido hidrolizado de lactoferrina, que se liofilizan para obtener aproximadamente 10.5 g de péptidos hidrolizados de lactoferrina en polvo. La pureza del péptido hidrolizado de lactoferrina obtenido se mide mediante HPLC, y como resultado, se encuentra que es 99%. Adicionalmente, se determinan las secuencias de aminoácidos del péptido hidrolizado de lactoferrina, y como resultado, se confirma que el péptido hidrolizado de lactoferrina producido contiene los péptidos de lactoferrina F₃₆-F₆₀ y lactoferrina F₃₆-A₆₁. La relación de existencia de estos péptidos (lactoferrina F₃₆-F₆₀:lactoferrina F₃₆-A₆₁) es 1:6.

Aquí adelante, la presente invención se explicará en detalle con referencia a los siguientes ejemplos de prueba.

[Ejemplo de Prueba 1]

Esta prueba se realiza con el fin de examinar el efecto de la adición de una mezcla de hidrolizado de lactoferrina en acción citotóxica de complemento y el fármaco de anticuerpos.

5 (1) Muestras de prueba

La muestra de prueba 1 se prepara con la mezcla de hidrolizado de lactoferrina preparada en el Ejemplo de Preparación 1, de la que la concentración se ajusta a 1000 pg/ml en medio RPMI 1640 (Sigma, número de catálogo: R8758) que contiene 7.5% de suero bovino fetal (Gibco, número de catálogo: 10099-141) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, número de catálogo: 15070-063) [en adelante esta solución se denomina como "solución de dilución"]. Adicionalmente, la Muestra de Control 1 se prepara al diluir lactoferrina en una concentración de 1000 pg/ml con la solución de dilución.

Como las células objetivo para la medición de la acción citotóxica de complemento y el fármaco de anticuerpos, se utilizan las células Raji de linfoma de Burkitt humano (ATCC CCL-86, obtenido del American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA)), y las células se suspenden en una densidad de 2×10^6 células/ml al utilizar la solución de dilución para preparar una suspensión celular Raji. Como un fármaco de la solución de anticuerpo, se utiliza rituximab (Zenyaku Kogyo, vendido por Nippon Roche) que reconoce el antígeno CD20, y se prepara en una concentración de 200 pg/ml utilizando la solución de dilución. Como una solución de complemento, se utiliza el suero humano AB (Cosmobio, número de catálogo: 832000027). Esta solución de fármaco de anticuerpos y solución de complemento también se utilizan para los Ejemplos de Prueba 2 a 5 descritos adelante.

La determinación de la viabilidad de las células se realiza por el método utilizando yoduro de propidio (PI, Dojindo, número de catálogo: P378) [Cytometry, Vol. 8, No. 4, pp.421-426, 1987] o el método utilizando Calceína-AM (Dojindo, número de catálogo: 341-07901) [Apoptosis, Vol. 3, No. 3, pp.195-202, 1998].

(2) Método de prueba

La suspensión celular Raji se agrega a cada pozo de una placa de cultivo de 24 pozos (NUNC, número de catálogo: 143982) en un volumen de 100 µl cada uno (2×10^5 células cada uno). Los 24 pozos se dividen en cuatro grupos, en los pozos (6 pozos) de un grupo entre ellos, 50 µl/pozo del fármaco de la solución de anticuerpo y 250 µl/pozo de la solución de dilución se agregan como "Adición del fármaco de anticuerpo". Adicionalmente, en los pozos (6 pozos) de otro grupo, 100 µl de la solución de complemento y 200 µl de la solución de dilución se agregan como "Adición de complemento". Adicionalmente, en los pozos (6 pozos) de otro grupo, 50 µl de la solución de fármaco de anticuerpos, 100 µl de la solución de complemento y 150 µl de la solución de dilución se agregan como "Adición del fármaco de anticuerpos + complemento". En los pozos (6 pozos) del grupo restante, 300 µl de la solución de dilución se agrega como "Sin adición".

Para cuatro grupos mencionados anteriormente, 100 µl/pozo de Muestra de prueba 1 (4 grupos x 2 pozos), la Muestra de Control 1 (4 grupos x 2 pozos) o la solución de dilución (4 grupos x 2 pozos) mencionados anteriormente se agrega como "Grupo 1 de muestra de prueba", "Grupo 1 de Muestra de Control" y "Grupo 1 de Muestra Negativa", respectivamente.

Al utilizar la placa de 24 pozos preparada como se describió anteriormente, las células se cultivan bajo condiciones de 37° C y 5 % de dióxido de carbono (CO₂) durante 1 hora utilizando una incubadora (Napco, número de catálogo: 5300). Luego, las células de cada grupo de muestra se recolectan, y el índice de células muertas en cada uno se examina mediante el método mencionado anteriormente utilizando PI. Se calcula la actividad citotóxica con base en un caso en donde todas las células objetivo mueren, que se toma como 100 %.

(3) Resultados de la prueba

Los resultados de esta prueba son como se muestra en la Tabla 1. Como se ve claramente a partir de los resultados mostrados en la Tabla 1, con "Adición de fármaco de anticuerpos + complemento", se confirma la actividad citotóxica en cada grupo de muestra ("Grupo 1 de muestra de prueba": 45.7 %, Grupo 1 de Muestra de Control": 24.3 %, "Grupo 1 de Muestra Negativa": 30.7 %), y se encuentra que, en particular, la mezcla de hidrolizado de lactoferrina (Grupo 1 de muestra de prueba) mejora marcadamente la actividad citotóxica (aumento de aproximadamente 50% comparado con el Grupo 1 de Muestra Negativa). Por otra parte, la actividad citotóxica no se aumenta en el Grupo 1 de la Muestra de Control comparado con el grupo de muestra negativa, y por lo tanto se encuentra que la mejora de la actividad citotóxica es una actividad específica para la mezcla de hidrolizado de lactoferrina.

Tabla 1

	Actividad citotóxica (%)		
	Grupo 1 de muestra de prueba	Grupo 1 de la Muestra de Control	Grupo 1 de Muestra Negativa
Adición de fármaco de anticuerpos + complemento	45.7	24.3	30.7
Adición de fármaco de anticuerpo	0.9	1.0	1.0
Adición de complemento	1.5	1.2	1.1
Sin adición	1.2	1.0	1.3

[Ejemplo de Prueba 2]

5 Esta prueba se realiza con el fin de examinar el cambio en la sensibilidad de células neoplásicas objetivo cultivadas con la adición de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina durante el cultivo para actividad citotóxica de complemento y el fármaco de anticuerpos.

(1) Muestra de prueba

La mezcla de hidrolizado de lactoferrina preparada en el Ejemplo de Preparación 1 se diluye en una concentración de 1000 µg/ml con la solución de dilución utilizada en el Ejemplo de Prueba 1 para preparar la Muestra de prueba 2.

10 (2) Método de prueba

Se suspenden células Raji de linfoma Burkitt humano en 6.3 ml de la solución de dilución con un número de células de 2×10^5 células/matraz de cultivo (BD, número de catálogo: 35-3014). Para la suspensión anterior, se prepara un grupo al que se agrega 0.7 ml de las Muestras de prueba 2 mencionadas anteriormente (Grupo 2 de la Muestra de prueba) y un grupo al que se agrega 0.7 ml de la solución de dilución (Grupo 2 de Muestra Negativa), respectivamente, y las células se cultivan durante tres días bajo las condiciones de 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂) utilizando una incubadora.

20 Las células de ambos grupos de muestra se agregan nuevamente con 10 ml de cada solución de dilución y se centrifugan (1100 rpm x 6 minutos) al utilizar una centrifuga (KUBOTA, número de catálogo: 5910) para retirar el sobrenadante. Este procedimiento se repite 3 veces, y luego se examina la sensibilidad de las células a la actividad citotóxica al utilizar los mismos sistemas como "Adición de fármaco de anticuerpos + complemento" y "Sin adición" utilizados en el Ejemplo de Prueba 1.

(3) Resultados de la prueba

25 El resultado de esta prueba son como se muestra en la Tabla 2. Como se ve claramente a partir de los resultados mostrados en la Tabla 2, la sensibilidad a la actividad citotóxica proporcionada a "complemento + fármaco de anticuerpo" se aumenta claramente en el grupo de las células neoplásicas objetivo cultivadas durante 3 días con la adición de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina (Grupo 2 de Muestra de prueba) comparado con el Grupo 2 de Muestra Negativa, y así se encuentra que la acción mejorada se clarifica en el Ejemplo de Prueba 1 que actúa en las células neoplásicas objetivo.

Tabla 2

	Actividad citotóxica (%)	
	Grupo 2 de Muestra de prueba	Grupo 2 de Muestra Negativa
Adición de fármaco de anticuerpos + complemento	53.9	34.8
Sin adición	1.9	1.5

[Ejemplo de Prueba 3]

Esta prueba se realiza con el fin de examinar el efecto de la adición de un péptido hidrolizado de lactoferrina en la citotoxicidad de complemento y el fármaco de anticuerpos.

(1) Muestras de prueba

- 5 La mezcla de hidrolizado de lactoferrina preparada en el Ejemplo de Preparación 1 se diluye en una concentración de 1000 pg/ml con la solución de dilución utilizada en el Ejemplo de Prueba 1 para preparar la Muestra de prueba 3. Adicionalmente, el péptido hidrolizado de lactoferrina preparado por el Ejemplo de Preparación 2 se diluye en una concentración de 1000 pg/ml con la misma solución de dilución para preparar la Muestra de prueba 4.

(2) Método de prueba

- 10 Las células Raji de linfoma de Burkitt humano se suspenden en la solución de dilución en una densidad de 2×10^5 células/ml para preparar una suspensión celular, y esta suspensión celular se agrega a cada uno de los 18 pozos de una placa de cultivo de 96 pozos (NUNC, número de catálogo: 167008) en un volumen de 50 µl cada (1×10^4 células cada uno). Los 18 pozos se dividen en dos grupos, en los pozos (9 pozos) de un grupo, 10 µl/pozo del fármaco de la solución de anticuerpo, 20 µl/pozo de la solución de complemento y 10 µl/pozo de la solución de dilución se agregan como "Adición de fármaco de anticuerpos + complemento". En los pozos (9 pozos) del grupo restante, se agrega 40 µl de la solución de dilución como "Sin adición". Para cada uno de los 2 grupos mencionados anteriormente, 10 µl/pozo de Muestra de prueba 3 (2 grupos x 3 pozos), Muestra de prueba 4 (2 grupos x 3 pozos) o la solución de dilución (2 grupos x 3 pozos) mencionada anteriormente se agrega como "Grupo 3 de Muestra de prueba", "Grupo 4 de Muestra de Control" y "Grupo 2 de Muestra Negativa", respectivamente.
- 20 Al utilizar la placa de 96 pozos preparada como se describió anteriormente, las células se cultivan bajo las condiciones de 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂) durante 1 hora utilizando una incubadora. Luego, se recolectan las células de cada grupo de muestra, y el índice de células muertas en cada uno se examina por el método mencionado anteriormente utilizando PI. La actividad citotóxica se calcula con base en un caso en donde todas las células objetivo mueren, que se toma como 100%.

(3) Resultados de la prueba

Los resultados de esta prueba son como se muestra en la Tabla 3. Como se ve claramente a partir de los resultados mostrados en la Tabla 3, se encuentra que el péptido hidrolizado de lactoferrina (Grupo 4 de Muestra de prueba) también mejora marcadamente la actividad citotóxica ejercida por complemento y anticuerpo (aumento de aproximadamente 67% comparado con Grupo 2 de Muestra Negativa).

30 Tabla 3

	Actividad citotóxica (%)		
	Grupo 3 de Muestra de Prueba	Grupo 4 de Muestra de Prueba	Grupo 2 de Muestra Negativa
Adición de fármaco de anticuerpos + complemento	77.4	86.5	51.9
Sin adición	-0.1	3.1	-0.5

[Ejemplo de Prueba 4]

- 35 En esta prueba, se examina la actividad citotóxica mejora la acción (recuperación de sensibilidad) de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina al utilizar células neoplásicas objetivo que muestran diferentes susceptibilidades para la actividad citotóxica de complemento y anticuerpo.

(1) Muestra de prueba

La mezcla de hidrolizado de lactoferrina preparada en el Ejemplo de Preparación 1 se diluye en una concentración de 1000 µg/ml con la solución de dilución utilizada en el Ejemplo de Prueba 1 para preparar la Muestra de prueba 5.

(2) Método de prueba

Las células Daudi derivadas de linfoma (ATCC CCL-213, obtenido de American Type Culture Collection), células Raji (ATCC CCL-86, obtenido de American Type Culture Collection), células SKW6.4 (ATCC TIB-215, obtenido de American Type Culture Collection) y células ARH-77 derivadas de linfoma (ATCC CRL-1621, obtenido de American Type Culture Collection) que tienen resistencia a un fármaco de anticuerpos cada uno se suspenden en la solución de dilución a un número de células de 2×10^6 células/ml para preparar suspensiones celulares, y cada suspensión celular se agrega a una placa de cultivo de 24 pozos (NUNC, número de catálogo: 143982) en un volumen de 100 µl/pozo (2×10^5 cada uno).

El examen de la actividad citotóxica se realiza en la misma forma como la utilizada para el sistema de "Adición de fármaco de anticuerpos + complemento" del Ejemplo de Prueba 1. Es decir, a cada uno de los pozos a los que se agrega cada suspensión celular, se agregan 50 µl del fármaco de la solución de anticuerpo, 100 µl de la solución de complemento y 150 µl de la solución de dilución, y 100 µl de la Muestra de prueba 5 mencionada anteriormente o la solución de dilución se agrega adicionalmente como "Grupo 5 de Muestra de prueba" y "Grupo 3 de Muestra Negativa", respectivamente.

Al utilizar la placa de 24 pozos preparada como se descubrió anteriormente, se cultivan células bajo las condiciones de 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂) durante 1 hora utilizando una incubadora (Napco, número de catálogo: 5300). Luego, las células de cada grupo de muestras se recolectan, y el índice de células muertas en cada uno se examina mediante el método mencionado anteriormente utilizando PI. La actividad citotóxica se calcula con base en un caso en donde todas las células objetivo mueren, que se toma como 100%.

(3) Resultados de la prueba

Los resultados de esta prueba son como se muestra en la Tabla 4. Como se ve claramente a partir de los resultados mostrados en la Tabla 4, la reducción de la sensibilidad a la actividad citotóxica de complemento y anticuerpo por la mezcla de hidrolizado de lactoferrina no se confirma para las células Daudi, que muestran una alta sensibilidad a la actividad citotóxica. Para las células Raji y SKW6.4, se confirma el efecto para mejorar la actividad citotóxica de complemento y anticuerpo.

Adicionalmente, para las células ARH-77, que son células derivadas de linfoma que muestran resistencia a la actividad citotóxica de complemento y anticuerpo (que tienen resistencia a un fármaco de anticuerpo), se confirma el efecto de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina para eliminar la resistencia a la actividad citotóxica. Se considera que se debe a que la mezcla de hidrolizado de lactoferrina tiene un efecto para mejorar la sensibilidad a la actividad citotóxica para células neoplásicas que tienen resistencia a un fármaco de anticuerpos y se recupera de la actividad citotóxica de complemento y el fármaco de anticuerpos.

Tabla 4

	Actividad citotóxica (%)	
	Grupo 5 de Muestra de Prueba	Grupo 3 de Muestra Negativa
Daudi	97.1	96.4
Raji	49.0	27.2
SKW6.4	38.9	19.8
ARH-77	15.5	0.0

[Ejemplo de Prueba 5]

En esta prueba, la mezcla de hidrolizado de lactoferrina, el péptido parcial de lactoferrina y lactoferrina no descompuesta etc. como control se utilizan como muestras para examinar el efecto del mismo en la actividad citotóxica de complemento y fármaco de anticuerpos para células Raji de linfoma Burkitt humano objetivo.

(1) Muestras de prueba

La mezcla de hidrolizado de lactoferrina preparada en el Ejemplo de Preparación 1 se utiliza como la Muestra A, y el péptido hidrolizado de lactoferrina (péptido parcial de lactoferrina) preparada en el Ejemplo de Preparación 2 se utiliza como la Muestra e B. Más aún, como las Muestras de Control, la lactoferrina bovina comercialmente disponible (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) se utiliza como el Control A, y el sulfato de protamina se utiliza como el Control B.

(2) Método de prueba

Se utilizan células Raji en la fase de crecimiento logarítmica como las células objetivo. Las células Raji se recolectan mediante la centrifugación de una suspensión celular se suspenden en caldo de cultivo fresco (RPMI 1640, 10% de FCS), se cuentan y luego se agregan a una placa de 24 pozos en una cantidad de 1.0×10^5 células/pozo. A cada pozo, se agregan rituximab (10 mg/ml) y 1.0 mg/ml como una concentración final de la Muestra A, Muestra B, Control A o Control B (o Medio [caldo de cultivo] en lugar de la muestra), y luego suero humano normal (tipo AB) se agrega a una concentración final de 10%. Luego, las células se cultivan en una incubadora de CO₂ durante 1 hora, y PI (yoduro de propidio, 1 mg/ml) se agrega durante los últimos 15 minutos del cultivo. Después de terminación del cultivo, se recolectan todas las células Raji mediante centrifugación para retirar el sobrenadante, y las células se resuspenden en 0.5 ml de PBS (regulador de fosfato). Las células Raji que mueren durante el cultivo se cuentan al analizar la suspensión con un citómetro de flujo (FACScan) utilizando el hecho que las células muertas son positivas en el tefido nuclear con PI.

En esta prueba, la actividad citotóxica se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación.

Actividad citotóxica (%) = (Número de células positivas PI)

/ (Número de células total) x 100

(3) Resultados de la prueba

Los resultados de esta prueba son como se muestra en la Figura 1. Como se ve claramente de los resultados mostrados en la Figura 1, cuando el Control A se utiliza como una muestra, la actividad citotóxica [número de células muertas (%)] es comparable con aquella observada con Medio (caldo de cultivo). En contraste, cuando se utiliza la Muestra A, la actividad citotóxica aumenta, y adicionalmente, cuando la Muestra B se separa de la mezcla de hidrolizado de lactoferrina cuando se utiliza la Muestra A, se observa aumento de la actividad citotóxica comparado con aquella observada con la Muestra A. Sin embargo, con la adición del Control B, no se observa tal aumento de actividad.

Es decir, se confirma que la Muestra B, que es un componente contenido en la Muestra A, también tiene una acción que mejora CDC (citotoxicidad dependiente de complemento). Adicionalmente, debido a que no se confirma el mejoramiento de la reacción por CDC con el Control B, que es una sustancia similar a la Muestra B y rico en aminoácidos básicos, también se aclara que la propiedad del péptido (basicidad) no afecta necesariamente la acción que mejora la reacción por CDC. Sobre la base de estos resultados, se encuentra que la acción que mejora la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos y complemento es una acción extremadamente específica a la Muestra A (mezcla de hidrolizado de lactoferrina) o Muestra B (péptido parcial de lactoferrina).

[Ejemplo de Preparación 3]

Preparación de un fármaco para terapia contra el cáncer utilizando mezcla de hidrolizado de lactoferrina como ingrediente activo

La lactosa (Maigret, 600 g), almidón de maíz (Nisshin Flour Milling Co., Ltd., 400 g), celulosa cristalina (Wako Pure Chemical Industries, 400 g) y la mezcla de hidrolizado de lactoferrina producida en el Ejemplo de Preparación 1 (600 g) se tamizaron a través de un tamiz de malla 50 (Yamato Scientific), se pone en una bolsa de polietileno que tiene un espesor de 0.5 mm, se mezcla mediante inversión y se llena en cápsulas (Japan Elanco, cápsula de gelatina No. 1, Op. Amarillo No. 6 Cuerpo, peso vacío: 75 mg) en una cantidad de 275 mg/cápsula al utilizar una máquina de relleno de cápsula automática completa (Cesere Pedini, tipo de prensa) para obtener 7000 cápsulas del fármaco que tienen un efecto para mejorar la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos.

[Ejemplo de Preparación 4]

Preparación de un fármaco para terapia contra el cáncer utilizando el péptido hidrolizado de lactoferrina como ingrediente activo

Se pone celulosa cristalina (Wako Pure Chemical Industries, 20 g) en un mortero de 1000-ml de volumen (Nakashima Mfg. Co., Ltd.), se agrega 20 ml de agua y se mezcla. Luego, a la mezcla, se agrega 25 g de lactosa (Maigret) se tamiza previamente a través de un tamiz de malla 48 (Wakamori), y se agrega 55 g del péptido hidrolizado de lactoferrina preparado en el Ejemplo de Preparación 2 y se mezcla. La masa húmeda obtenida se pone en un tamiz de malla 20 (Wakamori) y se extrude manualmente en una placa de acero inoxidable para secado para preparar gránulos, y los gránulos se distribuyen uniformemente y rápidamente, se ponen en un secador y se seca 25° C durante dos días para obtener gránulos finos. Estos gránulos se tamizaron a través de un tamiz de polietileno de malla 20 (Wakamori), y los gránulos que se pasan a través del tamiz se esparcen sobre una lámina de papel grande, se agregan con 2 g de estearato de magnesio (Kanto Kagaku) tamizado previamente a través de un

tamiz de malla 48 y se hace uniforme mediante mezcla manual. Los gránulos se hacen en comprimidos en una máquina de elaboración de comprimidos (Kimura Seisakusho, Model KT-2) utilizando un pestillo R que tiene un diámetro de 8 mm con presión de compresión establecida para las condiciones de elaboración de un número de 10 comprimidos de 6.2 g y dureza Monsanto de 3.5 a 5.0 kg para obtener 16 comprimidos del fármaco que tiene un efecto para mejorar la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos que contiene aproximadamente 50% del péptido hidrolizado de lactoferrina.

Aplicabilidad Industrial

Debido a que el ingrediente activo del fármaco para terapia contra el cáncer se puede obtener a partir de una materia prima comparativamente económica tal como leche de vaca, esta se puede producir a gran escala. Adicionalmente, al mejorar la actividad citotóxica de complemento y fármaco de anticuerpos con el fármaco, las células neoplásicas objetivo se pueden lesionar o matar eficientemente. Adicionalmente, también tiene un efecto de recuperar la actividad citotóxica de complemento y fármaco de anticuerpos para células neoplásicas que tienen resistencia al fármaco de anticuerpos. Es decir, el uso combinado del fármaco cumple lo solicitado para realizar continuamente una terapia con un fármaco de anticuerpos aún para un paciente que tiene recurrencia de un tumor maligno que tiene resistencia al fármaco de anticuerpos y juzga que el tratamiento terapéutico con el fármaco de anticuerpos es difícil. Esto proporciona evidentemente un hito novedoso para superar la resistencia del fármaco de anticuerpos en terapia contra el cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

<120> Fármaco para terapia contra el cáncer

<130> FP1600PC5001

<150> JP2004-80454

<151> 2004-03-19

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 708

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<22> sig_peptide

<222> (1) ... (19)

<223> Lactoferrina

<400> 1

Met Lys Leu Phe Val Pro Ala Leu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gly Leu

1 5 10 15

Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln

20 25 30

Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu

35 40 45

Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys

50	55	60	
Ile Arg Ala Ile Ala Glu Lys Lys Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly			
65	70	75	80
Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Arg Asp Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val			
	85	90	95
Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr			
	100	105	110
Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Gln Leu			
	115	120	125
Gln Gly Arg Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp			
	130	135	140
Ile Ile Pro Met Gly Ile Leu Arg Pro Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Ser			
145	150	155	160
Leu Glu Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Lys Phe Phe Ser Ala Ser Cys			
	165	170	175
Val Pro Cys Ile Asp Arg Gln Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys			
	180	185	190
Lys Gly Glu Gly Glu Asn Gln Cys Ala Cys Ser Ser Arg Glu Pro Tyr			
	195	200	205
Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp			
	210	215	220
Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys			
225	230	235	240
Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn Asn Ser Arg Ala			
	245	250	255
Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His			
	260	265	270
Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Lys			
	275	280	285
Leu Leu Ser Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Arg Ser			
	290	295	300
Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Pro Gly Gln Arg Asp Leu Leu Phe Lys			
305	310	315	320

Asp Ser Ala Leu Gly Phe Leu Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala
 325 330 335
 Leu Tyr Leu Gly Ser Arg Tyr Leu Thr Thr Leu Lys Asn Leu Arg Glu
 340 345 350
 Thr Ala Glu Glu Val Lys Ala Arg Tyr Thr Arg Val Val Trp Cys Ala
 355 360 365
 Val Gly Pro Glu Glu Gln Lys Lys Cys Gln Gln Trp Ser Gln Gln Ser
 370 375 380
 Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Thr Ala Ser Thr Thr Asp Asp Cys Ile
 385 390 395 400
 Val Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Gly
 405 410 415
 Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu
 420 425 430
 Asn Arg Lys Ser Ser Lys His Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro
 435 440 445
 Thr Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly
 450 455 460
 Leu Thr Trp Asn Ser Leu Lys Asp Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val
 465 470 475 480
 Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Val Asn Gln
 485 490 495
 Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro
 500 505 510
 Gly Ala Asp Pro Lys Ser Arg Leu Cys Ala Leu Cys Ala Gly Asp Asp
 515 520 525
 Gln Gly Leu Asp Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu Lys Tyr Tyr Gly
 530 535 540
 Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp Val Ala
 545 550 555 560
 Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Thr
 565 570 575
 Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys

580 585 590
 Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys His Leu
 595 600 605
 Ala Val Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala
 610 615 620
 His Val Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn
 625 630 635 640
 Gly Lys Asn Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys
 645 650 655
 Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Lys Leu Gly Gly
 660 665 670
 Arg Pro Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr Val Thr Ala Ile
 675 680 685
 Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Ala
 690 695 700
 Phe Leu Thr Arg
 705

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Bos taurus

<400> 2

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 20 25

<210> 3

<211> 26

10 <212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene un hidrolizado péptico de lactoferrina que tiene un número de peso molecular promedio de 500 a 5000 para uso en mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, o en una terapia de anticuerpos contra el cáncer.
- 5 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el índice de degradación del hidrolizado péptico de lactoferrina es 6 a 20%.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer es uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B o cáncer de colon.
- 10 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el fármaco de anticuerpos es un anticuerpo anti-CD20, anticuerpo monoclonal anti-HER2 o anticuerpo anti-17-1A (factor de adhesión de célula epitelial relacionada con tumor humano).
5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer es un cáncer que tiene resistencia al fármaco de anticuerpos.
- 15 6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la acción que mejora la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos es una acción para aumentar la sensibilidad de las células objetivo al fármaco de anticuerpos.
7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene uno o más tipos de péptidos seleccionados de los siguientes péptidos (a) y (c) para uso en mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, o en una terapia de anticuerpos contra el cáncer:
- 20 (a) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- (c) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cáncer es uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B o cáncer de colon.
- 25 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el fármaco de anticuerpos es un anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti- HER2 monoclonal o anticuerpo anti-17-1A (factor de adhesión de célula epitelial relacionada con tumor humano).
10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones a 9, en donde el cáncer es un cáncer que tiene resistencia al fármaco de anticuerpos.
- 30 11. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la acción que mejora la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos es una acción para aumentar la sensibilidad de las células objetivo al fármaco de anticuerpos.
12. El alimento o bebida que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 35 13. Uso de una composición farmacéutica que contiene un hidrolizado de péptido de hidrolizado de lactoferrina que tiene un número de peso molecular promedio de 500 a 5000 para la producción de un fármaco para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, o para una terapia de anticuerpos contra el cáncer.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el índice de degradación del hidrolizado péptico de lactoferrina es 6 a 20%.
- 40 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el cáncer es uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B o cáncer de colon.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el fármaco de anticuerpos es un anticuerpo anti-CD20, anticuerpo monoclonal anti-HER2 o anticuerpo anti-17-1A (factor de adhesión de célula epitelial relacionada con tumor humano).
- 45 17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el cáncer es un cáncer que tiene resistencia al fármaco de anticuerpos.

18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde la acción que mejora la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos es una acción en aumentar la sensibilidad de las células objetivo al fármaco de anticuerpos.

5 19. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 de uno o más tipos de los siguientes péptidos de (a) y (c) para la producción de un fármaco para mejorar la actividad citotóxica de un fármaco de anticuerpos en una terapia de anticuerpos contra el cáncer, o para una terapia de anticuerpos contra el cáncer.

(a) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(c) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

10 20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el cáncer es uno cualquiera de cáncer de mama, linfoma de célula B o cáncer de colon.

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el fármaco de anticuerpos es un anticuerpo anti-CD20, anticuerpo monoclonal anti-HER2 o anticuerpo anti-17-1A (factor de adhesión de célula epitelial relacionada con tumor humano).

15 22. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde el cáncer es un cáncer que tiene resistencia al fármaco de anticuerpos.

23. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde la acción que mejora la actividad citotóxica del fármaco de anticuerpos es una acción para aumentar la sensibilidad de las células objetivo al fármaco de anticuerpos.

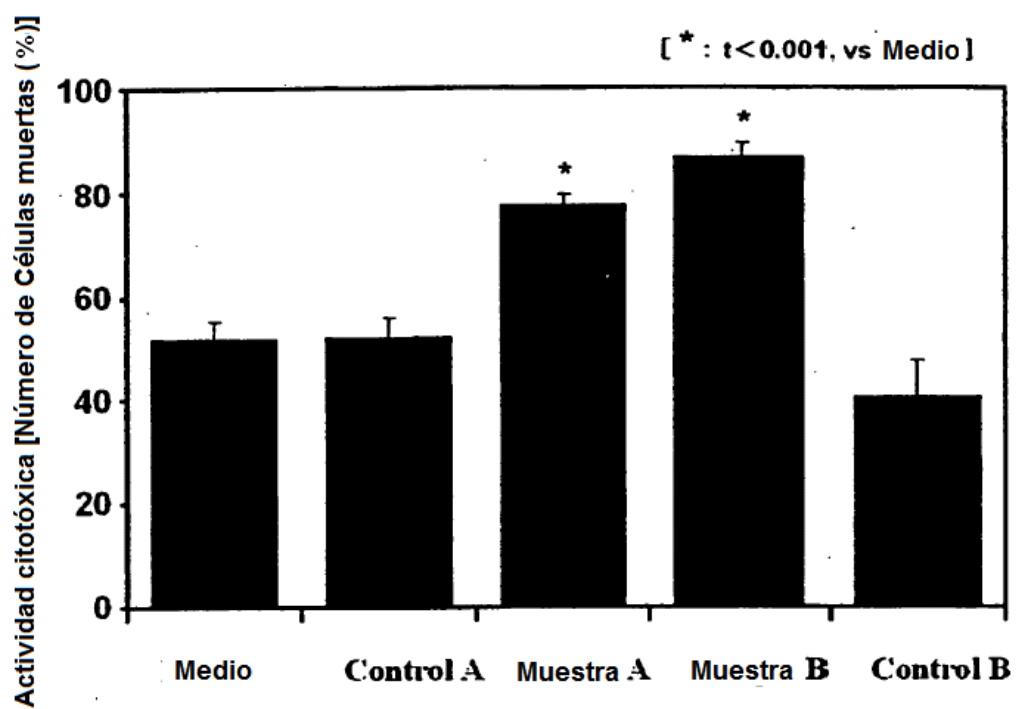


Fig. 1