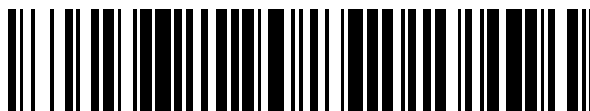


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 069**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/36** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61K 39/285** (2006.01)  
**A61P 25/02** (2006.01)  
**A61P 25/04** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08828811 .3**  
96 Fecha de presentación: **28.08.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2191836**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **Agentes profilácticos o de alivio para trastorno nervioso periférico inducido por agente anti-cáncer**

30 Prioridad:  
**31.08.2007 JP 2007225420**  
**14.02.2008 JP 2008032626**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.07.2012**

73 Titular/es:  
**Kyushu University, National University Corporation**  
**6-10-1 Hakozaki Higashi-ku Fukuoka-shi**  
**Fukuoka 812-8581, JP y**  
**Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.**

72 Inventor/es:  
**OISHI, Ryozo;**  
**ITOH, Yoshinori y**  
**EGASHIRA, Nobuaki**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 385 069 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**

Agentes profilácticos o de alivio para trastorno nervioso periférico inducido por agente anti-cáncer

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un nuevo uso médico de un extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna, y de forma particular, se refiere a un agente profiláctico o de alivio de un trastorno nervioso periférico inducido por un agente anti-cáncer que contiene, como un principio activo, un extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna.

**Técnica anterior**

10 En tratamiento de cáncer actual (tumor maligno) se usan cirugía, irradiación o quimioterapia solas o en cualquier combinación de las mismas según se requiera. Entre ellas los agentes anti-cáncer (agentes anti-tumor maligno) usados en la quimioterapia presentan inherentemente citotoxicidad o inhibición celular y daño no sólo a células de cáncer (tumor maligno) sino también a células normales humanas provocando efectos secundarios. Por tanto, es importante que los agentes anti-cáncer se administren a pacientes de modo que se evite o reduzca tales efectos secundarios tanto como sea posible y proporcionen suficientes efectos anti-cáncer (anti-tumor maligno).

15 Ejemplos de los efectos secundarios provocados por la administración de agentes anti-cáncer incluyen trastornos de la sangre, trastornos gastrointestinales y trastornos nerviosos, y, de forma particular han aumentado como tendencia reciente los trastornos nerviosos agudos o crónicos. Esta tendencia se considera que es provocada por los siguientes factores: recurrencia frecuente de trastornos nerviosos como un efecto secundario principal de nuevos agentes anti-cáncer que proporcionan efectos anti-cáncer reseñables, los efectos de terapia con múltiples fármacos como terapia principal reciente, y una tendencia de mejora de efectos secundarios tales como trastornos sanguíneos y trastornos gastrointestinales. De esta forma no se encuentran disponibles contramedidas efectivas contra los trastornos nerviosos que son un efecto secundario principal provocado por la quimioterapia de cáncer actual, una vez que los trastornos se han desarrollado, debido a la dificultad de la regeneración de células nerviosas. Por lo tanto pueden provocarse varios síntomas o trastornos irreversibles por la dificultad de la regeneración de células nerviosas. De acuerdo con lo anterior los trastornos nerviosos que son el principal efecto secundario constituyen un importante problema terapéutico.

20 Los trastornos nerviosos provocados por la administración de agentes anti-cáncer se observan además de en el sistema nervioso central, el sistema nervioso autonómico, y el sistema nervioso periférico, en los órganos de los sentidos tales como sentido del gusto. Entre ellos trastornos nerviosos que suceden con una frecuencia comparativamente alta para llegar a ser problemáticos se encuentran dolores tales como un dolor con escozor y dolor con quemazón, parestesia tal como entumecimiento de extremidades inferiores y una sensación de quemazón, hiperestesia tal como hipersensibilidad a estímulos de frío, disestesia tal como pérdida sensorial, parálisis sensorial y sensación de malestar y trastornos nerviosos en el sistema nervioso periférico tales como ataxia sensorial y debilidad muscular. Las lesiones en el sistema nervioso periférico inducidas por la administración de agentes anti-cáncer se consideran principalmente debidas a la degeneración axonal. Los microtúbulos en el axón juegan un importante papel en el mantenimiento de la función normal de células, por ejemplo, formando un huso durante la división celular, disponiendo los orgánulos subcelulares y transportando sustancias. Los fármacos de taxano tales como paclitaxel y docetaxel y fármacos de alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina dirigen los microtúbulos a inhibir la proliferación de células tumorales malignas. Por tanto se considera que los microtúbulos en células nerviosas normales son también dañadas para provocar los trastornos nerviosos. Además se considera que los fármacos de platino tales como oxaliplatino, carboplatino, cisplatino y nedaplatino dañan directamente las células nerviosas y en consecuencia se provoca en segundo término axonopatía.

30 Sin embargo la neurotoxicidad de los agentes anti-cáncer no se ha estudiado con detalle y aún no se han establecido procedimientos preventivos y de soporte para los trastornos nerviosos. Por lo tanto para aliviar síntomas de entumecimiento se usan preparaciones de vitamina tales como mecobalamina y una medicina herbácea china, gosha-jinki-gan. Para dolores se usan un antidepresivo (clorhidrato de amitriptilina), un agente antiepiléptico (carbamazepina), un agente antiarrítmico (clorhidrato de mexiletina), adrenocorticoesteroides y similares. Sin embargo, el tratamiento radical o profilaxis aún no se ha establecido. De acuerdo con lo anterior detener o reducir la administración de un agente medicinal es el único procedimiento factible para prevenir el desarrollo de los trastornos nerviosos (no obstante, incluso tras detener la administración, los trastornos nerviosos pueden continuar o empeorar). A la vista de los anteriores problemas, se han requerido en gran medida en las prácticas clínicas agentes profilácticos o de alivio efectivos contra un trastorno nervioso inducido por agentes anti-cáncer.

50 El extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna como un principio activo en el agente medicinal de la presente invención se describe que presenta los siguientes efectos: un efecto analgésico, efecto sedante, efecto antiestrés y efecto anti-alérgico (véase el documento de patente 1); un efecto inmunoestimulador, efecto anti-cáncer y

efecto inhibitorio de la cirrosis (véase el documento de patente 2); un efecto de tratamiento contra púrpura trombocitopénica idiopática (véase el documento de patente 3); un efecto de tratamiento contra neuralgia postherpética, edema cerebral, demencia, degeneración espinocerebral y similares (véase el documento de patente 4); un efecto de tratamiento contra síndrome de Raynaud, neuropatía diabética, secuelas de neuropatía mielo-óptica subaguda y similares (véase el documento de patente 5); un efecto inhibitorio de la producción de calicreína y efecto de mejora de trastorno circulatorio periférico (véase el documento de patente 6); un efecto de mejora de la atrofia ósea (véase el documento de patente 7); un efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico efectivo para el tratamiento de sepsis y choque endotóxico (véase el documento de patente 8); un efecto de tratamiento contra osteoporosis (véase el documento de patente 9); un efecto de tratamiento contra SIDA basado en un efecto inhibitorio de la acción de Nef y efecto inhibitorio de producción de quimioquina (documentos de patentes 10 y 11); un efecto de tratamiento contra trastornos isquémicos tales como infarto cerebral (documento de patente 12); un efecto de tratamiento contra síndrome de fibromialgia (documento de patente 13); y un efecto de tratamiento contra infecciones (documento de patente 14) y similares.

De forma particular el documento de patente 5 describe que el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna como un principio activo en el agente medicinal de la presente invención mejora los síntomas tales como entumecimiento, dolor, sensación de frío en piernas y parestesia que son provocados por la disfunción de tejidos u órganos isquémicos debido a trastornos de circulación sanguínea locales de organismos vivos. Sin embargo, el efecto de mejora del entumecimiento, dolor, sensación de frío en piernas, parestesia y similares por el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna descrita en el documento de patente 5 es un efecto basado en el efecto de mejora de la corriente sanguínea en una afección isquémica debido a los trastornos de circulación sanguínea. Por el contrario tal efecto de prevención o alivio en la presente invención en trastornos nerviosos periféricos como efecto secundario (daño celular) inducido por la administración de agentes anti-cáncer es el efecto del extracto en los trastornos nerviosos periféricos que presenta mecanismos de desarrollo completamente diferentes y son hallazgos desconocidos. Es decir, no es conocido que el extracto sea efectivo para, por ejemplo, alivio de trastornos nerviosos periféricos que se considera que son provocados por el daño de microtúbulos de axones nerviosos, desmielinación de axones nerviosos, daño directo a células nerviosas y similares inducido por la administración de agentes anti-cáncer, y tal uso médico aún no se ha publicado ni descrito.

[Documento de patente 1]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-53-101515

[Documento de patente 2]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-55-87724 (páginas 3, 5 y 6)

[Documento de patente 3]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-1-265028 (páginas 1 y 2)

[Documento de patente 4]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-1-319422 (páginas 3 y 4)

[Documento de patente 5]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-2-28119 (página 3)

[Documento de patente 6]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-7-97336 (página 4)

[Documento de patente 7]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-8-291077

[Documento de patente 8]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-10-194978

[Documento de patente 9]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-11-80005 (páginas 2 y 3)

[Documento de patente 10]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-11-139977

[Documento de patente 11]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-2000-336034 (páginas 2 y 3)

5 [Documento de patente 12]

Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-2000-16942

[Documento de patente 13]

Publicación internacional nº WO 2004/039383

[Documento de patente 14]

10 Publicación de solicitud de patente japonesa nº JP-A-2004-300146

### **Divulgación de la invención**

[Problema a resolver con la invención]

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar un agente medicinal que sea efectivo y de gran seguridad para la prevención o alivio de un trastorno nervioso periférico que desempeñe su función cuando tenga lugar un efecto secundario tras la administración de un agente anti-cáncer.

[Medios para solventar el problema]

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo estudios intensivos, y como resultado, han encontrado que un extracto de un tejido inflamado inoculado con virus de vacuna proporciona un efecto de prevención o alivio excelente en un trastorno nervioso periférico inducido por un agente anti-cáncer, y se ha llevado a cabo la presente invención.

20 [Efectos de la invención]

El extracto de un tejido inflamado inoculado con virus de vacuna presenta excelentes efectos farmacológicos de prevención o alivio del trastorno nervioso periférico inducido por la administración de un agente anti-cáncer. Además, el agente medicinal de la presente invención que contiene el extracto como un principio activo presenta menos problemas tales como efectos secundarios y es seguro y de gran utilidad.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un resultado experimental del ensayo de von Frey sobre el efecto de alivio del extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención en la hiperestesia inducida por la administración de paclitaxel.

30 La figura 2 es un resultado experimental del ensayo de la acetona sobre el efecto de alivio del extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención en la hiperestesia inducida por la administración de paclitaxel.

La figura 3 es un resultado experimental que usa células PC12 sobre el efecto supresor del extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención en la inhibición de la excrecencia de neuritas inducida por paclitaxel.

35 La figura 4 es un resultado experimental que usa células DRG sobre el efecto supresor del extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención en la inhibición de la excrecencia de neuritas inducida por paclitaxel.

La figura 5 es un resultado experimental del ensayo de von Frey sobre el efecto de alivio del extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención en la hiperestesia inducida por oxaliplatino.

40 La figura 6 es un resultado experimental del ensayo en placa fría sobre el efecto de alivio del extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención en la hiperestesia inducida por oxaliplatino

### Mejores modos para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un agente profiláctico o de alivio de un trastorno nervioso periférico inducido por un agente anti-cáncer que contiene, como un principio activo, un extracto de un tejido inflamado inoculado con virus de vacuna. El agente anti-cáncer que desarrolla el trastorno nervioso periférico en la presente invención es un agente anti-cáncer que daña de forma específica microtúbulos para inducir el trastorno nervioso periférico. Ejemplos de tal agente medicinal incluyen fármacos de taxano tales como paclitaxel y docetaxel y fármacos de alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina. Adicionalmente ejemplos del agente medicinal que daña células nerviosas para provocar axonopatía y luego inducir el trastorno nervioso periférico incluyen fármacos de platino tales como oxaliplatino, carboplatino, ciplatino y nedaplatino. Ejemplos del trastorno nervioso periférico inducido por estos agentes anti-cáncer incluyen dolor, entumecimiento, parestesia, disestesia e hiperestesia. Debido al trastorno, el deterioro tal como ataxia se refleja en la vida diaria, por ejemplo, dificultad para coger un objeto, dificultad para abrochar botones y alteraciones al andar, o reducción del reflejo del tendón del sueño. El trastorno nervioso periférico inducido por un agente anti-cáncer que se pretende prevenir o mejorar con el agente medicinal de la presente invención incluye un trastorno nervioso periférico inducido por monoterapia que usa un tipo de agente anti-cáncer así como también un trastorno nervioso periférico inducido por terapia de fármaco múltiple en el que se administra una pluralidad de agentes medicinales que presentan diversos mecanismos de acción o mediante modulación bioquímica en la que se diseñan una combinación de agentes medicinales y un procedimiento de administración tal que los agentes medicinales que presentan diversos mecanismos de acción pueden proporcionar la máxima efectividad.

Para el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna usado en el agente medicinal de la presente invención hay diversos informes de sustancias fisiológicamente activas producidas en los tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna, el procedimiento para extracción de sustancias de los tejidos dañados, las actividades farmacológicas y similares como se citaron anteriormente (por ejemplo, documentos de patente 1 a 14).

Adicionalmente una preparación de un extracto de pieles inflamadas de conejos inoculados con virus de vacuna es un producto farmacéutico comercialmente disponible. La preparación, como se describe en las páginas 2697 a 2699 de "Drugs in Japan, Ethical Drugs" (2007, editado y publicado por Japan Pharmaceutical Information Center), es un agente medicinal que contiene sustancias activas no proteicas y separadas del tejido de piel inflamada de conejos inoculados con virus de vacuna. La preparación es conocida por ser efectiva contra dolor lumbar, síndrome cervicobraquial, neuralgia sintomática, periartrosis escapulohumeral, osteoartritis, picazón acompañado con enfermedades de la piel (eccema, dermatitis, urticaria), rinitis alérgica, secuelas de neuropatía mielo-óptica subaguda tal como sensación de frío, parestesia y dolor, neuralgia postherpética y similares. La preparación está aprobada como un fármaco autorizado en la forma de productos para inyección hipodérmica, intramuscular e intravenosa y de comprimidos y se encuentra comercialmente disponible.

El extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna usado en el agente medicinal de la presente invención es una sustancia de regulación de la biofunción no proteica extraída del tejido inflamado inoculado con virus de vacuna como se describió anteriormente, y la preparación de la solución extraída de pieles inflamadas de conejos inoculados con virus de vacuna listada en "Drugs in Japan, Ethical Drugs" está aprobada como un producto farmacéutico y se encuentra comercialmente disponible. Además se pueden usar diversos extractos de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna descritos en los documentos de patente descritos anteriormente como la sustancia de la presente invención, y se dan también en los documentos sus procedimientos de producción, dosis adecuada y similares.

El extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna usados en el agente medicinal de la presente invención se pueden obtener de la siguiente forma: se trituran tejidos inflamados por la inoculación con virus de vacuna; se añade un disolvente de extracción para eliminar los fragmentos de tejido; luego se lleva a cabo la desproteínización; se adsorbe la solución desproteínizada sobre un adsorbente; y luego se eluye el principio activo.

El extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna se produce, por ejemplo, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- (a) se recogen tejidos de piel inflamada de conejos, ratones o similares mediante la inoculación con virus de vacuna, y se trituran los tejidos inflamados. Se añade al tejido triturado un disolvente de extracción tal como agua, agua fenólica, solución salina fisiológica o agua con glicerina a la que se añadió fenol. Luego se filtra o centrifuga la mezcla para obtener un líquido de extracción (filtrado o sobrenadante).
- (b) el pH del líquido de extracción se ajusta para que sea ácido y el líquido se calienta para desproteínización. Luego se ajusta la solución desproteínizada para ser alcalinizada, calentada y luego filtrada o centrifugada.
- (c) El filtrado o sobrenadante obtenido se acidifica y adsorbe en un adsorbente tal como carbono activado o caolín.

- (d) Al adsorbente se añade un disolvente de extracción como agua, se ajusta el pH hasta alcalinidad y se eluye el componente adsorbido para obtener el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna. Subsiguientemente, según se desee, el eluido puede evaporarse hasta sequedad a presión reducida o liofilizarse para dar un material seco.

5 Como animales para la obtención de los tejidos inflamados por la inoculación del virus de vacuna se pueden usar diversos animales que se infectan con virus de vacuna tales como conejos, vacas, caballos, ovejas, cabras, monos, ratas o ratones, y siendo tejidos inflamados preferidos los tejidos de piel inflamada de conejos.

10 Se recogen y Trituran los tejidos inflamados y se añade de 1 a 5 volúmenes de disolvente de extracción para hacer una suspensión emulsionada. Para el disolvente de extracción se pueden usar agua destilada, solución salina fisiológica, tampón débilmente ácido a débilmente básico y similares, y estabilizadores tales como glicerina, agentes antibacterianos/antisépticos tales como fenol, y se pueden añadir de forma adecuada sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio o cloruro de magnesio. En este momento se puede facilitar la extracción mediante ruptura de los tejidos celulares con tratamiento, tal como congelación y descongelación, ondas ultrasónicas, enzimas que disuelven la membrana celular o tensioactivos.

15 El líquido de extracción emulsionado obtenido se somete a filtración, centrifugación o similares para eliminar fragmentos de tejido, y luego se desproteíniza. La operación de desproteínización se puede llevar a cabo mediante un procedimiento generalmente conocido, por ejemplo, tratamiento térmico, tratamiento con una proteína desnaturizante tal como un ácido, base, urea y guanidina, tratamiento con un disolvente orgánico tal como acetona, precipitación isoelectrónica y desalado. Luego se elimina la proteína insoluble precipitada mediante un procedimiento general para la  
20 eliminación de insolubles tal como filtración usando papel de filtro (por ejemplo, celulosa o nitrocelulosa), filtros de vidrio, celite, filtros Seitz o similares, ultrafiltración y centrifugación.

25 El líquido de extracción que contiene principios activos obtenidos de este modo se acidifica, preferiblemente se ajusta a pH 3,5 a 5,5 con un ácido tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido bromhídrico, y luego se adsorbe en un adsorbente. Ejemplos de adsorbente que se puede usar incluyen carbono activado y caolín. El adsorbente se puede añadir al líquido de extracción para agitar, o el líquido de extracción se puede hacer pasar a través de una columna rellena con el adsorbente para adsorber los principios activos en el adsorbente. Cuando se añade el adsorbente al líquido de extracción la solución se elimina mediante filtración, centrifugación, o similares para obtener el adsorbente en el que se adsorben los principios activos.

30 Con el fin de eluir (desorber) los principios activos del adsorbente se añade un disolvente de elución al adsorbente para eluir a temperatura ambiente o con calentamiento adecuado o con agitación, y se elimina el adsorbente mediante un procedimiento general tal como filtración, centrifugación o similares. Para el disolvente de elución que se va a usar se puede usar un disolvente básico tal como agua, metanol, etanol o isopropanol que se ajustan para que tengan un pH básico o una mezcla adecuada de los mismos, y preferiblemente agua ajustada a pH 9 a 12.

35 El extracto (eluido) obtenido de este modo se puede preparar propiamente de una forma adecuada como un material de partida para una formulación o una formulación farmacéutica. Por ejemplo, la solución se puede ajustar para que tenga pH casi neutro para ser un material de partida para una formulación y se puede ajustar para tener una concentración deseada mediante concentración o dilución. Además para una formulación para inyección se puede añadir cloruro de sodio para preparar una solución isotónica con la solución salina fisiológica. Adicionalmente, la solución se puede concentrar hasta sequedad o liofilizar para preparar una forma sólida disponible para el material de  
40 partida de comprimidos o similares.

45 Ejemplos de un procedimiento de administración para un paciente incluyen administración para vía oral y otras tales como administraciones por vía subcutánea, intramuscular e intravenosa. La dosis se puede determinar de forma adecuada en función del tipo de extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna. La dosis que está aprobada en la preparación comercialmente disponible de acuerdo con "Drugs in Japan, Ethical Drugs" (página 2499) es principalmente 16 UN por día mediante administración por vía oral y de 3,6 a 7,2 un por día mediante inyección como un fármaco autorizado. Sin embargo la dosis se puede ser aumentada o reducida de forma apropiada en función del tipo de enfermedad, grado de severidad, diferencia individual en los pacientes, procedimiento de administración, periodo de administración y similares (UN: unidad de neurotropina. Unidad de neurotropina se define con el valor DE<sub>50</sub> de efecto analgésico medido mediante un procedimiento Randall-Selitto modificado usando ratones estresados con  
50 SART que son animales estresados crónicos que muestran un umbral de dolor más reducido que los animales normales. Un UN indica la actividad de 1 mg de ingredientes analgésicos en preparaciones de neurotropina cuando el valor DE<sub>50</sub> es 100 mg/kg de la preparación).

55 En adelante se describen ejemplos de procedimientos para la producción de un extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna así como también resultados de un ensayo farmacológico que implica la actividad farmacológica nueva del extracto, es decir, el efecto de prevención o alivio del trastorno nervioso inducido por agentes

anti-cáncer. La presente invención no se pretende que se limite a las descripciones de los ejemplos.

### [Ejemplos]

#### [Ejemplo 1]

5 Se inocularon pieles de conejos adultos sanos con virus de vacuna. Las pieles inflamadas se eliminaron y trituraron y a las pieles trituradas se añadió agua con fenol. Luego se filtró la mezcla a presión, y se ajustó el filtrado obtenido a pH 5 con ácido clorhídrico, y luego se calentó de 90 a 100° C durante 30 minutos. Después de la desproteización mediante filtración se ajustó el filtrado a pH 9 con hidróxido de sodio, se calentó adicionalmente de 90 a 100° C durante 15 minutos y luego se filtró. Se ajustó el filtrado hasta aproximadamente pH 4,5 con ácido clorhídrico y se añadió carbono activado al 2%. Se agitó la mezcla durante 2 horas y luego se centrifugó. Al carbono activado recogido se añadió agua. 10 Se ajustó la mezcla a pH 10 con hidróxido de sodio, se agitó a 60° C durante 1,5 horas, y luego se centrifugó y se filtró para obtener un sobrenadante. Al carbono activado recogido se añadió agua de nuevo. Se ajustó la mezcla a pH 11 con hidróxido de sodio, se agitó a 60° C durante 1,5 horas, y luego se centrifugó para obtener un sobrenadante. Se reunieron los dos sobrenadantes y se neutralizó con ácido clorhídrico para obtener un extracto de pieles inflamadas de conejos inoculados con virus de vacuna. En los siguientes ensayos farmacológicos se ajustó el extracto a una concentración apropiada para ser usada. 15

#### [Ejemplo 2]

20 Se inocularon pieles de conejos adultos sanos con virus de vacuna para ser infectados. Subsiguientemente se retiraron y se cortaron las pieles inflamadas asépticamente, y luego se añadió agua con glicerina a la que se añadió fenol. La mezcla se trituró con un homogenizador para ser emulsionada. Subsiguientemente se filtró la emulsión. Se ajustó el filtrado obtenido hasta acidez débil (pH 4,5 a 5,5) con ácido clorhídrico, luego se calentó a 100° C y luego se filtró. Se ajustó el filtrado hasta alcalinidad débil (pH 8,5 a 10,0) con hidróxido de sodio, se calentó adicionalmente a 100° C y luego se filtró. Se ajustó el filtrado hasta aproximadamente pH 4,5 con ácido clorhídrico, y se añadió carbono activado aproximadamente al 1,5%. Se agitó la mezcla durante 1 a 5 horas y luego se filtró. Al carbono activado recogido por la filtración se añadió agua. Se ajustó la mezcla de pH 9,4 a 10 con hidróxido de sodio, se agitó durante 3 a 5 horas y luego se filtró. Se neutralizó el filtrado con ácido clorhídrico. 25

#### [Ejemplo 3]

30 Se inocularon pieles de conejos adultos sanos con virus de vacuna para ser activados. Luego se retiraron y se cortaron las pieles activadas asépticamente, y se añadió agua. La mezcla se trituró con un homogenizador para ser emulsionada. Subsiguientemente se filtró la emulsión a presión. Se ajustó el filtrado obtenido hasta pH 5,0 con ácido clorhídrico, y luego se calentó a 100° C con vapor en flujo. Tras la desproteización por filtración se ajustó el filtrado a pH 9,1 con hidróxido de sodio, se calentó adicionalmente a 100° C y luego se filtró. Se ajustó el filtrado a pH 4,1 con ácido clorhídrico y se añadió carbono activo al 2%. Se agitó la mezcla durante 2 horas y luego se filtró. Se añadió adicionalmente al filtrado carbono activado al 5,5% y se agitó la mezcla durante 2 horas y luego se filtró. Se añadió agua al carbono activado recogido por la filtración anterior. Se ajustó la mezcla a pH 9,9 con hidróxido de sodio, se agitó a 60° C durante 1,5 horas y luego se filtró. Se añadió agua al carbono activado anteriormente y al carbono recién activado. Se ajustó la mezcla a pH 10,9 con hidróxido de sodio, se agitó a 60° C durante 1,5 horas y luego se filtró. Se reunieron los filtrados y se neutralizaron con ácido clorhídrico. Luego se desaló el filtrado mediante electrólisis usando una membrana con un peso molecular de 100, y se secó a presión reducida. 35

40 A continuación se muestra un ejemplo de los resultados de ensayo farmacológico que implica el efecto de alivio en trastornos nerviosos inducidos por agentes anti-cáncer en los que se usó como una sustancia de ensayo el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna de la presente invención obtenidos en el ejemplo 1. Aquí en todos los ensayos farmacológicos se usó el procedimiento Tukey-Kramer para un ensayo de significancia.

Ensayo farmacológico 1: efecto en trastorno nervioso periférico en rata inducido por paclitaxel

45 Se comprobó el efecto del extracto de la presente invención (el extracto de pieles inflamadas de conejos inoculados con virus de vacuna producido en el ejemplo 1) en hiperestesia tal como alodinia (dolor severo inducido por estímulos táctiles que normalmente no provocan dolor) mediante estímulos mecánicos y en parestesia en estímulos de baja temperatura inducidos por la administración de paclitaxel, un agente anti-cáncer. El extracto de la presente invención se administró por vía oral a ratas como una sustancia de ensayo, y se llevaron a cabo los siguientes experimentos (del ensayo de von Frey y del ensayo de la acetona).

50 (1) Administración de sustancia de ensayo

Se usaron ratas macho SD de 7 y 8 semanas de edad como animales experimentales y se separaron en tres grupos de un grupo de control, grupo administrado con paclitaxel, y grupo administrado con paclitaxel y la sustancia de ensayo

(grupo administrado con paclitaxel + sustancia de ensayo). Al grupo administrado con paclitaxel, se administró paclitaxel (6 mg/kg) por vía intraperitoneal una vez a la semana durante 4 semanas en un total de 4 veces. Al grupo administrado con paclitaxel + sustancia de ensayo, se administró la sustancia de ensayo (200 NU/kg) por vía oral tres veces a la semana, es decir, justo antes de la administración de paclitaxel y en los días 1 y 2 tras la administración de paclitaxel, durante 4 semanas en un total de 12 veces. Al grupo de control se administró de forma similar un disolvente (aceite de ricino de polioxietileno : etanol = 1:1) usado en la administración de paclitaxel.

### (2) Ensayo de von Frey

Se dispuso cada una de las ratas en tres grupos de (1) en una jaula con un fondo de malla de alambre, y se aclimató durante 1 hora. Subsiguientemente se prensó verticalmente un filamento de von Frey con una fuerza de flexión de 2, 4, 6, 8, 10 ó 15 g respecto al plantar posterior hasta que el filamento se dobló, y la presión se mantuvo durante 6 segundos. Esta operación se repitió 6 veces para cada una de las plantas posteriores derecha e izquierda para contar las reacciones de evasión. La medida se llevó a cabo después de 0, 2, 4, 5 y 6 semanas del comienzo de la administración. Se preparó un diagrama de dispersión donde la fuerza de flexión del filamento (g) era x y el número de reacciones de evasión era y. Luego en base a la curva sigmoidea de  $y = A/(1 + (\exp(-B \times (x - C))))$  obtenida por el procedimiento de mínimos cuadrados, se calculó la fuerza de flexión del filamento que corresponde a 6 reacciones (50%) como un valor umbral de reacción del 50% para evaluar el efecto de la sustancia de ensayo en alodinia.

Se muestra en la figura 1 un ejemplo de los resultados de ensayo. En el grupo administrado con paclitaxel el valor de umbral de reacción al 50% se reduce de forma reseñable en comparación con el del grupo de control. En el grupo administrado con paclitaxel + sustancia de ensayo en el que se administró paclitaxel en combinación con el extracto de la presente invención, se mostró sustancialmente el mismo valor umbral de reacción al 50% que en el grupo de control, y reduciendo el valor umbral de reacción al 50% se inhibió significativamente en comparación con el grupo administrado con paclitaxel. Adicionalmente en el grupo administrado con paclitaxel + sustancia de ensayo, se puso de manifiesto que el valor umbral del dolor continuaba siendo inhibido incluso tras completarse la administración de la sustancia de ensayo. De los anteriores resultados se determinó que el extracto de la presente invención tiene efecto de prevención o mejora excelente en la hiperestesia inducida por paclitaxel.

### (3) Ensayo de la acetona

Se dispuso cada una de las ratas de los tres grupos de (1) en una jaula con un fondo de malla de alambre y se aclimató durante 1 hora. Luego se pulverizó 50 µl de acetona al pie posterior durante 5 segundos usando un micropulverizador (fabricado por Penn-Century, Inc) para proporcionar estímulos de frío usando el efecto de enfriamiento durante la vaporización de acetona. Se observó la reacción de evasión de la rata durante 40 segundos desde el comienzo de la pulverización, y se registró el tiempo hasta la reacción (tiempo latente). Se repitió el ensayo tres veces para cada uno de los pies izquierdo y derecho, y se calculó el valor medio.

Se muestra un ejemplo de los resultados de ensayo en la figura 2. Respecto a los estímulos de frío con acetona en el grupo administrado con paclitaxel, el tiempo latente se acortó de forma reseñable, pero en el grupo administrado con paclitaxel + sustancia de ensayo el tiempo latente fue registrado sustancialmente al mismo nivel que en el grupo de control. De los resultados se evidencia que el extracto de la presente invención tiene un efecto excelente en la parestesia (hipersensibilidad a estímulos de frío) inducida por paclitaxel. Por el contrario en el ensayo con estímulos de calor (ensayo plantar) el tiempo latente no se acortaba con la administración de paclitaxel, y también en el grupo administrado con paclitaxel + sustancia de ensayo el tiempo latente era casi el mismo que en el grupo de control y el grupo administrado con paclitaxel. Ejemplos del síntoma característico de un trastorno nervioso periférico inducido por agentes anti-cáncer incluyen hipersensibilidad respecto a estímulos de frío. El ensayo (ensayo de la acetona) refleja el síntoma y por tanto el resultado muestra un efecto de prevención o mejora excelente del extracto de la presente invención en la hiperestesia provocada por agentes anti-cáncer.

Ensayo farmacológico 2: efecto en desnaturalización de células nerviosas inducidas por paclitaxel en sistema de ensayo in vitro

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos con el fin de examinar el efecto farmacológico del extracto de la presente invención en desnaturalización de células nerviosas inducida por el tratamiento de paclitaxel, un agente anticáncer, usando células de feocromocitoma 12 de rata (PC 12) y células de ganglios de médula espinal (DRG) que son líneas celulares modelo para diferenciación neuronal y excrecencia de neuritas.

### (1) Cultivo de células

Se cultivaron células PC 12 en un matraz de 80 cm<sup>3</sup> usando medio RPMI 1640 (fabricado por MP Biomedicals, LLC) que contiene suero bovino fetal al 5%, suero de caballo al 10% y penicilina-estreptomocina 100 unidades / ml (fabricado por Gibco BRL) a 37° C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5%.



A parte de lo anterior se cultivaron en primer lugar células DRG de ratas Sprague-Dawley y luego se trataron cinco nodos de L4-5 DRG con colagenasa tipo I (fabricado por Funakoshi Corporation) y dispasa I (fabricado por Sanko Junyaky Co., Ltd), luego se sembró en una placa de 24 pocillos y se cultivó. El cultivo se llevó a cabo usando medio Eagle modificado de Dulbecco (medio DMEM, fabricado por MP Biomedicals, LLC) que contiene suero bovino fetal al 10% y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina (fabricado por Gibco BRL) a 37° C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5%.

## (2) Tratamiento de fármaco y medida de la longitud de neurita del fármaco

Se sembraron las células PC 12 en una placa de 24 pocillos a 10.000 células/pocillo, y después de 3 horas se trataron con forskolina 10 µM para inducir la excrecencia de neuritas. Después de 24 horas se llevó a cabo el tratamiento con fármaco. Por otro lado se cultivaron las células DRG durante una semana, se comprobaron la adhesión celular y la excrecencia de neuritas, y luego se llevó a cabo el tratamiento con fármaco. El tratamiento con fármaco se llevó a cabo con un fármaco usando 10 ng/ml de paclitaxel solo y un fármaco usando una combinación de 10 ng/ml de paclitaxel y la sustancia de ensayo que presenta cada uno una concentración (0,001, 0,003, 0,01 o 0,03 UN/ml). Después de 24 y 96 horas del tratamiento con fármaco se reemplazó el medio con un nuevo medio de cultivo que contiene el fármaco y la sustancia de ensayo presentando cada uno una concentración predeterminada. Después de 168 horas se distinguieron células muertas que son coloreadas con un tinte azul tripano, y se tomaron fotomicrografías ópticas (x 200, 3 campos de vista/pocillo). Después de tomar las imágenes, usando software de análisis Image J, se midió la longitud de neurita en las células vivas.

Se muestra un ejemplo de los resultados de ensayo en las figuras 3 y 4. Este reveló que en ambas células PC 12 y células DRG, la excrecencia de neuritas era inhibida por paclitaxel, pero por el contrario, el tratamiento de combinación con el extracto de la presente invención suprimió de forma significativa la inhibición de la excrecencia de neuritas en función de la concentración. De forma particular el efecto anterior se observó en las células DRG como células nerviosas. Por lo tanto se sugiere que uno de los mecanismos de acción del efecto de alivio del extracto de la presente invención en el trastorno nervioso periférico es la supresión del trastorno de la excrecencia de neuritas.

## Ensayo farmacológico 3: efecto en trastorno nervioso periférico de rata inducido por oxaliplatino

De forma similar al ensayo farmacológico 1 se examinó el efecto del extracto de la presente invención (el extracto de pieles inflamadas de conejos inoculados con virus de vacuna producidos en el ejemplo 1) en hiperestesia tal como alodinia a estímulos a baja temperatura inducidos por la administración de oxaliplatino, un fármaco de platino. El oxaliplatino es el agente medicinal que más frecuentemente provoca trastornos nerviosos periféricos y es muy deseable desarrollar procedimientos para evitar y mejorar los trastornos.

### (1) Administración de sustancia de ensayo

De forma similar al ensayo farmacológico 1 se separaron ratas en tres grupos de un grupo de control, grupo administrado con oxaliplatino y grupo administrado con oxaliplatino y la sustancia de ensayo (grupo administrado con oxaliplatino + sustancia de ensayo). El oxaliplatino (100 mg de formulación liofilizada) se disolvió en dextrosa al 5% en agua para ser usada. Al grupo administrado con oxaliplatino se administró por vía intraperitoneal oxaliplatino (4 mg/kg) dos veces (en dos días consecutivos) por semana durante 4 semanas, es decir, en un total de 8 veces. Al grupo administrado con oxaliplatino + sustancia de ensayo se administró por vía oral la sustancia de ensayo (200 UN/kg) tres veces a la semana, es decir, el día de comienzo y el segundo y el tercer días de la administración de oxaliplatino. Se administró la sustancia de ensayo justo antes de la administración de oxaliplatino, y la administración se continuó durante 4 semanas, es decir, en un total de 12 veces, Al grupo de control se administró de forma similar el disolvente (5% de dextrosa en agua) usado en la administración de oxaliplatino (1 ml/kg).

### (2) Ensayo de von Frey

De forma similar al ensayo farmacológico 1 (2), cada semana, en el día 6 del comienzo de la administración de oxaliplatino, se llevó a cabo el ensayo de von Frey para comprobar el efecto de la sustancia de ensayo en alodinia.

Se muestra un ejemplo de los resultados del ensayo (la segunda semana) en la figura 5. En la segunda semana del ensayo, en el grupo administrado con oxaliplatino, se redujo de forma notable el valor umbral de la reacción al 50% en comparación con el grupo de control. Por el contrario, en el grupo administrado con oxaliplatino + sustancia de ensayo en el que se administró oxaliplatino en combinación con el extracto de la presente invención, el valor umbral de reacción al 50% era sustancialmente el mismo que en el grupo de control, y reduciendo el valor umbral de reacción al 50% se inhibía de forma significativa en comparación con el grupo administrado con oxaliplatino. De los resultados se demuestra que el extracto de la presente invención tiene un efecto de prevención o mejora excelente en la hiperestesia inducida por oxaliplatino.

### (3) Ensayo en placa fría

5 Se llevó a cabo el ensayo en placa fría en el día 5 después de comenzar la administración de oxaliplatino para comprobar el efecto de la sustancia de ensayo en parestesia en estímulos de baja temperatura. En el día antes del ensayo cada una de las ratas de los tres grupos en (1) se dispuso en una placa fría (Hot/Cold plate número de catálogo 35100, fabricada por Ugo Basile Biological Research Apparatus) durante 30 minutos para ser aclimatada  
10 suficientemente. En el día del ensayo se dispuso la rata en la placa fría a 4° C. Luego se observó el comportamiento de la rata durante 150 segundos y se midió el tiempo de reacción para evasión de pata posterior (tiempo latente). Con el fin de eliminar sesgos de observador se llevó a cabo la observación del comportamiento bajo la condición de que no fuese conocido donde se administraba el fármaco a cada grupo de ratas. Se llevó a cabo el ensayo tres veces y se promediaron los resultados. Luego se calcularon los valores medios y el error estándar. Se llevaron a cabo múltiples comparaciones entre grupos, después de un análisis de una vía de la varianza (ANOVA de una vía), mediante las comparaciones entre cada grupo de forma similar a los otros ensayos farmacológicos de acuerdo con el procedimiento de Tukey-Kramer. Se usó Stat View (Abacus Concepts, Berkeley, CA, EEUU) para un ensayo de significancia, y se consideró el nivel de significancia de menos de 5% ( $p < 0,05$ ) como una diferencia significativa.

15 Se muestra en la figura 6 un ejemplo de los resultados del ensayo (la segunda semana). En la segunda semana del anterior ensayo, respecto al estímulo de frío mediante la placa de frío, en el grupo administrado con oxaliplatino, el tiempo latente se recortaba considerablemente, pero en el grupo administrado con oxaliplatino + sustancia de ensayo, el tiempo latente se recuperaba sustancialmente al mismo nivel que en el grupo de control. A partir de los resultados anteriores se demostró que el extracto de la presente invención tiene un efecto excelente en la parestesia (hipersensibilidad a estímulos de frío) inducida por oxaliplatino. De la misma forma que en paclitaxel, ejemplos del  
20 síntoma característico de un trastorno nervioso periférico inducido por oxaliplatino incluyen hipersensibilidad respecto a estímulos de frío. De la misma forma que en el resultado del ensayo de la acetona en el ensayo farmacológico 1 (3), el ensayo (ensayo de placa fría) releja el síntoma, y por tanto el resultado muestra un efecto de prevención o mejora excelente del extracto de la presente invención en la hiperestesia inducida por agentes anti-cáncer.

#### **Aplicabilidad industrial**

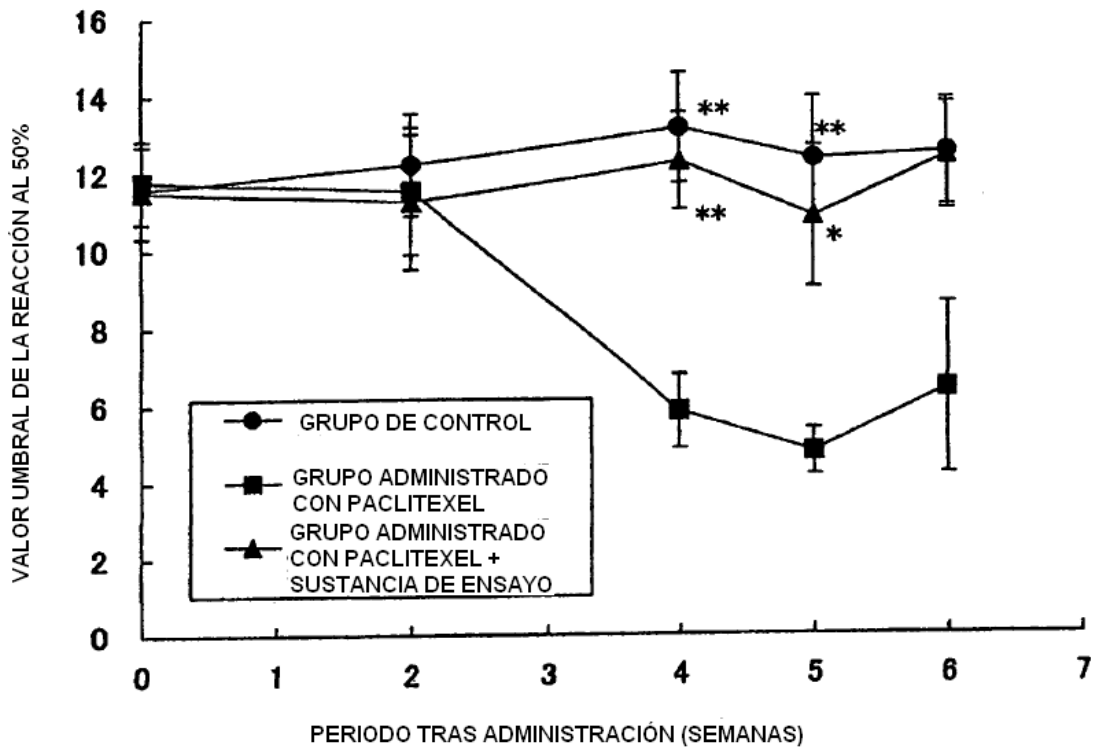
25 Como es evidente a partir de los resultados de los ensayos farmacológicos se puso de manifiesto que el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna de la presente invención tienen un excelente efecto de prevención o alivio en el trastorno nervioso periférico en los ensayos de administración por vía oral a rata en los que se usaron la hiperestesia tal como alodinia inducida por estímulos mecánicos y la parestesia en estímulos de baja temperatura inducidas por la administración de un agente anti-cáncer tal como paclitaxel u oxaplatino como índices  
30 del trastorno nervioso periférico. Adicionalmente, el extracto de tejido inflamado inoculado con el virus de vacuna de la presente invención presenta un efecto inhibitorio reseñable en el ensayo in vitro en la inhibición de la excrecencia de neuritas inducida por paclitaxel. Por tanto se puso de manifiesto que el extracto de tejidos inflamados inoculados con el virus de vacuna de la presente invención es efectivo contra al trastorno nervioso periférico inducido por la administración del agente anti-cáncer tal como paclitaxel u oxaplatino. La preparación disponible comercialmente de la solución extraída de pieles inflamadas de conejos inoculados con virus de vacuna se ha usado durante muchos años y se considera como un agente medicinal muy seguro. De este modo el extracto de tejidos inflamados inoculados con virus de vacuna de la presente invención es efectivo como el agente profiláctico o de alivio de  
35 trastornos nerviosos en el sistema nervioso periférico, por ejemplo, parestesia tal como entumecimiento de las extremidades inferiores e hiperestesia tal como dolores que son inducidos por un agente anti-cáncer y es un agente medicinal muy seguro y particularmente muy útil con pocos efectos secundarios.  
40

**REIVINDICACIONES**

1. Un extracto de un tejido inflamado inoculado con virus de vacuna para uso en la prevención, alivio o mejora de un trastorno nervioso periférico inducido por un agente anti-cáncer.
- 5 2. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente anti-cáncer es un inhibidor de microtúbulos.
3. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el inhibidor de microtúbulos es un fármaco de taxano.
4. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el fármaco de taxano es paclitaxel o docetaxel.
5. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el fármaco de taxano es paclitaxel.
- 10 6. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el inhibidor de microtúbulos es un fármaco del alcaloide de la vinca.
7. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente anti-cáncer es un fármaco de platino.
8. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el fármaco de platino es oxaliplatino, carboplatino, cisplatino o nedaplatino.
- 15 9. El extracto para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el fármaco de platino es oxaliplatino.
10. El extracto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el trastorno nervioso periférico inducido por un agente anti-cáncer es dolor agudo o crónico, entumecimiento, parestesia, hiperestesia o disestesia.
- 20 11. El extracto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el tejido inflamado es un tejido de piel de conejo.
12. El extracto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el extracto está en la forma de una preparación para vía oral.
13. El extracto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el extracto está en la forma de una preparación inyectable.

25

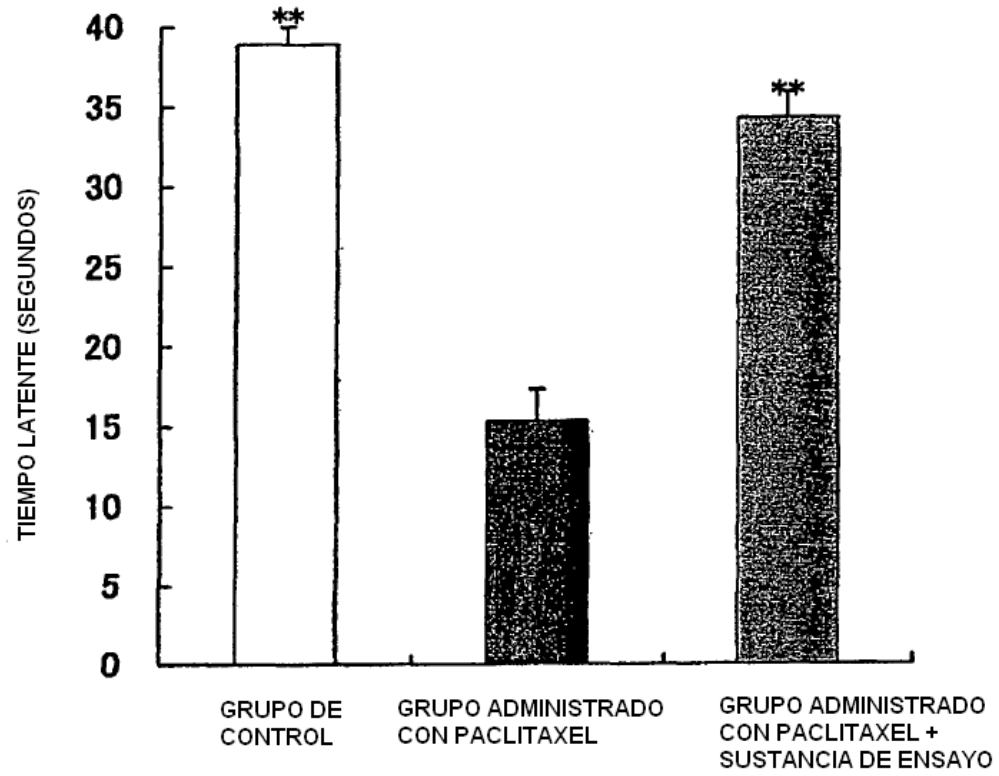
[FIG. 1]



\* : P < 0,05 vs GRUPO ADMINISTRADO CON PACLITAXEL

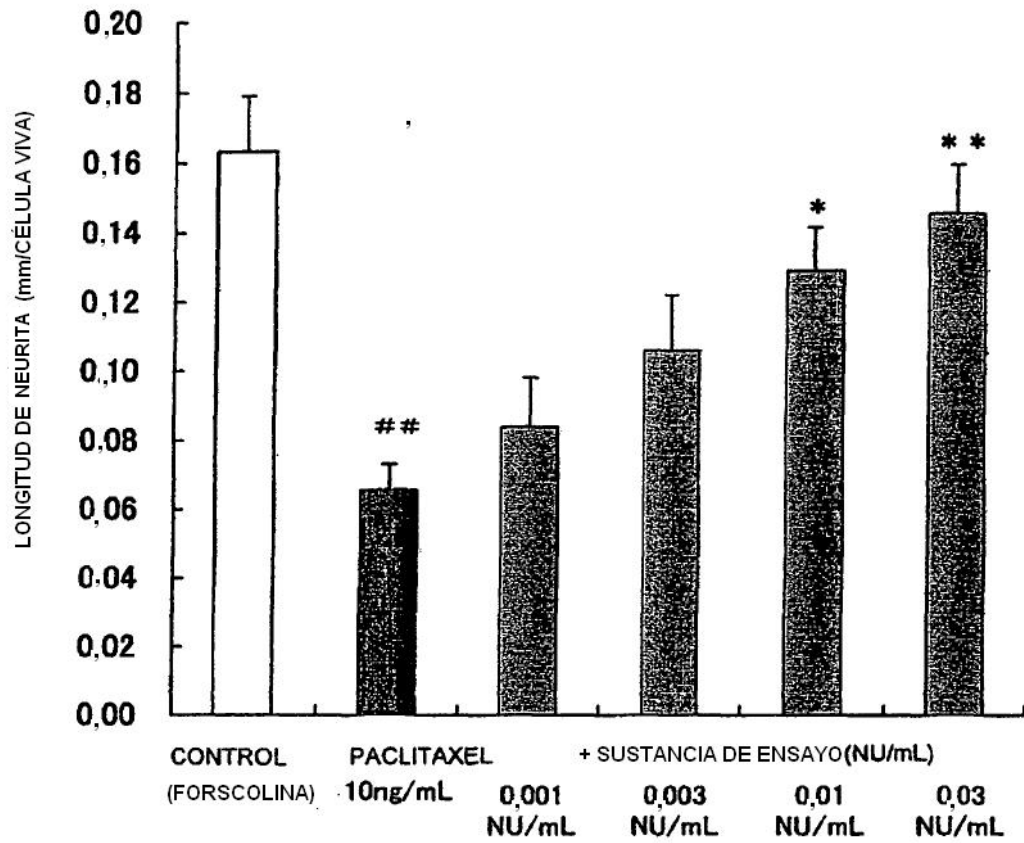
\*\* : P < 0,01 vs GRUPO ADMINISTRADO CON PACLITAXEL

{FIG. 2}



\*\* :  $p < 0,01$  vs GRUPO ADMINISTRADO CON PACLITAXEL

[FIG. 3]

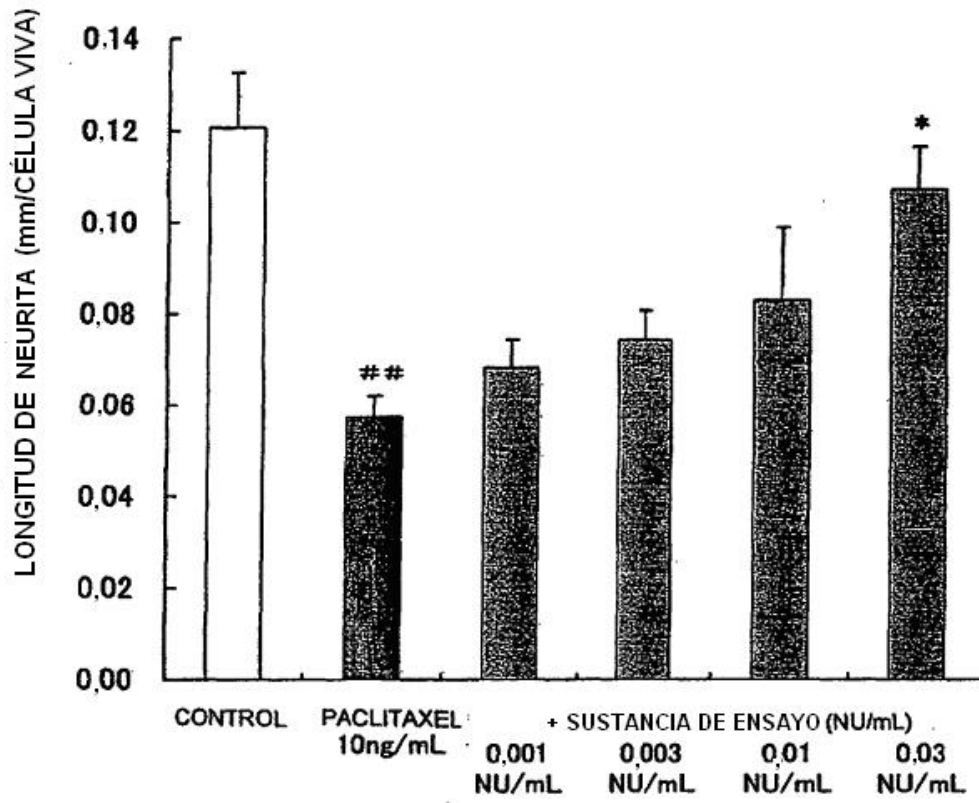


## : P < 0,01 vs CONTROL

\* : P < 0,05 VS PACLITAXEL

\*\* : P < 0,01 VS PACLITAXEL

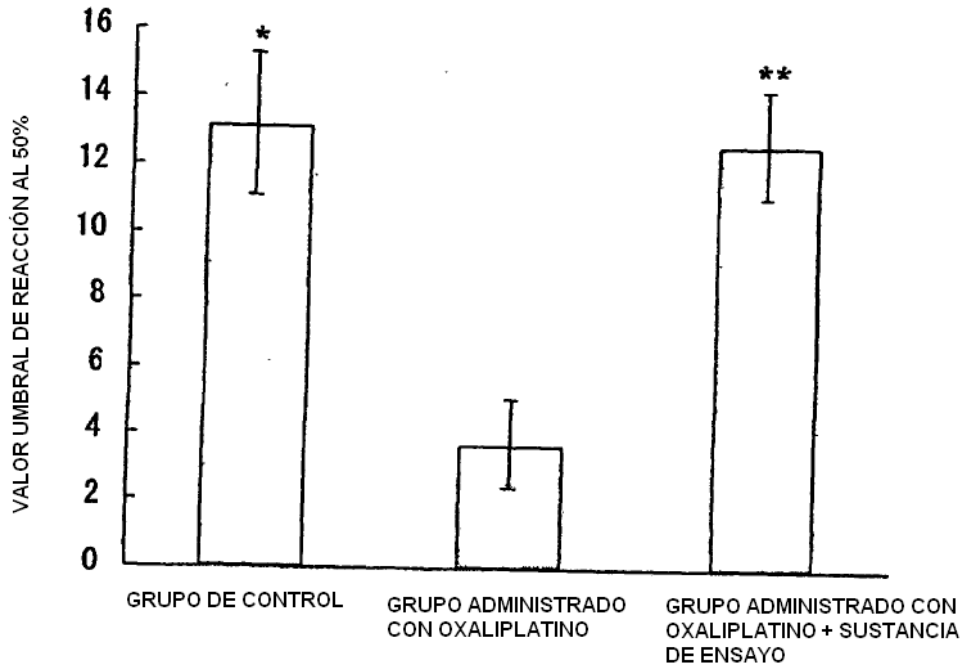
[FIG. 4]



## : P < 0,01 vs CONTROL

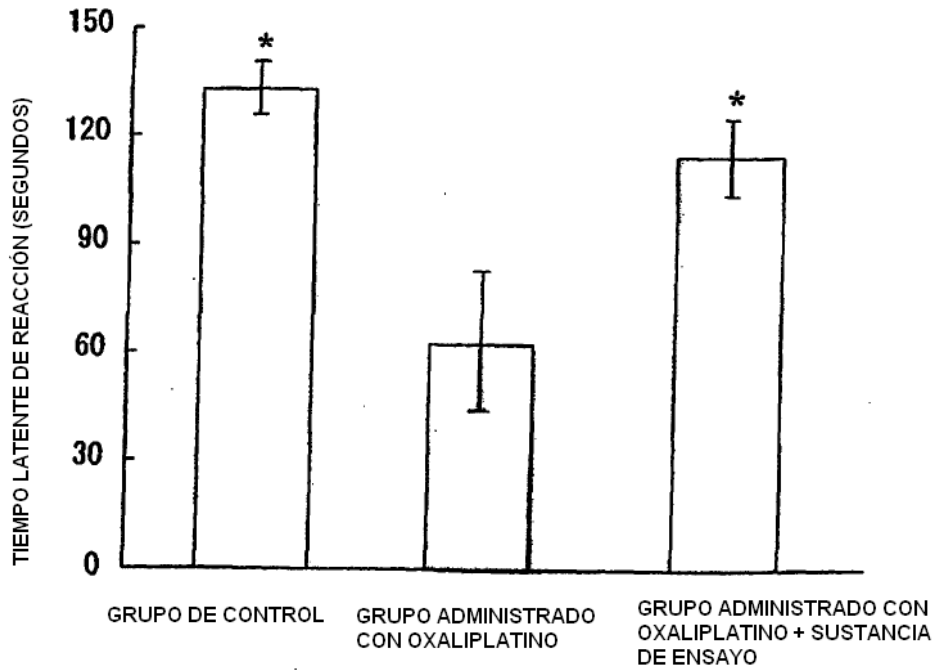
\* : P < 0,05 VS PACLITAXEL

[FIG. 5]



\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  vs. GRUPO ADMINISTRADO CON OXALIPLATINO

[FIG. 6]



\*:  $P < 0.05$  vs. GRUPO ADMINISTRADO CON OXALIPLATINO