

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 369**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2003 E 03752675 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 1506778**

54 Título: **Inhibidores de la expresión de TGF-a**

30 Prioridad:

**17.05.2002 JP 2002142862**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.06.2014**

73 Titular/es:

**KOWA COMPANY, LTD. (100.0%)  
6-29, Nishiki 3-chome, Naka-ku  
Nagoya-shi, Aichi 460-8625 , JP**

72 Inventor/es:

**KAGAWA, MASATAKA;  
SANO, TETSURO y  
ISHIBASHI, NAOTO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 470 369 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

Inhibidores de la expresión de TGF- $\alpha$

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un inhibidor contra la expresión de factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (denominado algunas veces en lo sucesivo "TGF- $\alpha$ " en la memoria descriptiva) que comprende como principio activo un compuesto de poliprenilo. La presente invención también se refiere a un inhibidor contra la transformación de una célula de hepatitis o una célula de cirrosis y un inhibidor contra la aparición, reaparición (segunda oncogénesis) y alteración maligna de hepatoma basándose de la inhibición anteriormente mencionada de la expresión de TGF- $\alpha$ .

Técnica anterior

10 La mortalidad por neoplasia maligna en 1999 fue de hasta 296.000, que es la peor causa de muerte en Japón. Entre ellos, más de 30.000 murieron de carcinoma hepatocelular. El número ha ido aumentando año tras año, y ha aumentado tres veces durante los últimos 20 años. Como causas principales de carcinoma hepatocelular aparecidas en Japón, el 90 % o más de la enfermedad se considera que se produce por infección continua (hepatitis crónica) con virus de la hepatitis B (denominado algunas veces en lo sucesivo "VHB" en la memoria descriptiva) o con virus de la hepatitis C (denominado algunas veces en lo sucesivo "VHC" en la memoria descriptiva). En cuanto al hepatoma, la reaparición (segunda oncogénesis) se observa en una relación anual de aproximadamente el 20 al 25 % después de tratamiento terapéutico, y así esta enfermedad produce un mal pronóstico. Por consiguiente, importantes objetivos futuros incluyen supresión de la oncogénesis hepática de hepatitis crónica y reaparición de hepatoma después del tratamiento, además de detección y tratamiento temprano de hepatoma.

20 Se cree que el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) participa significativamente en la oncogénesis hepática y alteración maligna (promoción/progresión) de células de hepatoma. Se informa que el nivel de expresión de TGF- $\alpha$  en el hígado está asociado con gravedad de inflamación en hepatitis por virus, y la expresión de TGF- $\alpha$  en exceso en cirrosis causada por virus de la hepatitis está relacionada con replicación del virus de la hepatitis. En un tejido hepático de un paciente que padece una enfermedad hepática crónica producida por infección por el VHB o VHC, una mayor expresión de TGF- $\alpha$  se observa con respecto a una persona sana. Una alta expresión de TGF- $\alpha$  también se observa en un tejido con cáncer de un paciente con hepatoma y tejidos no tumorales que rodean el cáncer. Por tanto, se sugiere una posibilidad de que TGF- $\alpha$  tenga funciones importantes en el proceso de infección por el virus de la hepatitis para la aparición y el desarrollo de hepatoma.

30 Se observa experimentalmente que las transformaciones de células de hígado de rata están asociadas a promociones de la expresión de TGF- $\alpha$ , y que TGF- $\alpha$  se expresa en un alto nivel en células hepáticas que se transforman con un carcinógeno químico hepático y un virus de la hepatitis. Además, en un ratón transgénico con TGF- $\alpha$  expresado en exceso se observa una alta relación de aparición espontánea de hepatoma, además de una sorprendente aceleración de la aparición de oncogénesis hepática por un carcinógeno químico y un gen de cáncer que se observa en este ratón.

35 Como se ha descrito anteriormente, el TGF- $\alpha$  participa significativamente en oncogénesis hepática y alteración maligna de células de hepatoma. Por tanto, se ha hecho una propuesta de que puede desarrollarse una nueva estrategia de tratamiento de hepatoma fijando TGF- $\alpha$  como diana.

40 Aunque todavía no se ha esclarecido un mecanismo preciso de la aparición de hepatoma en un paciente que padece hepatitis por virus crónica, se sugiere una posibilidad de funciones importantes de un citoblasto hepático (célula oval: denominada algunas veces en lo sucesivo "célula oval" en la memoria descriptiva). Se observan proliferaciones de células ovals en pacientes que padecen hepatitis o cirrosis crónica, y se observa un aumento del número de células ovals en proporción a la gravedad de la afección patológica hepática. Estos fenómenos se inducen basándose en el aumento de actividad de la división de células ovals y la proliferación debida a inflamación crónica en el hígado producida por el virus de la hepatitis. Al mismo tiempo, los virus de la hepatitis actúan de iniciador oncogénico sobre células ovals. Por consiguiente, se sugiere un mecanismo en el que una célula oval iniciada por un virus de la hepatitis promueve su actividad de división y proliferación (promoción) por inflamación crónica, que conduce a canceración (oncogénesis).

Además, en muchos experimentos de oncogénesis química hepática usando animales, algunos informes indican que el hepatoma se deriva de células hepáticas desdiferenciadas, mientras que otros informes indican una posibilidad de que la oncogénesis hepática se derive de células ovals como origen, debido a que un fenotipo de una célula de hepatoma tiene similitud a la de una célula oval.

50 Muchos estudios informan de relaciones entre células ovals y TGF- $\alpha$ . TGF- $\alpha$  es una sustancia que promueve la división de célula oval (mitógeno). El TGF- $\alpha$  producido en células ovals, por sí mismo, o en tejidos hepáticos de alrededor estimula la proliferación de células ovals mediante el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que es un receptor de TGF- $\alpha$ . Además, se revela que una célula oval, que se observa sorprendentemente en hepatitis crónica viral

de un ser humano, es una célula diana de la infección por el virus de la hepatitis y al mismo tiempo va acompañada de hiperexpresión de TGF- $\alpha$ . Por tanto, se sugiere una posibilidad de que células ovales, por sí mismas, puedan cambiar a células de hepatoma mediante la acción de virus de la hepatitis en una etapa temprana de la oncogénesis (iniciación) y la participación de TGF- $\alpha$  como promotor después de la iniciación.

- 5 Como se ha descrito anteriormente, la interacción entre la presencia de un virus en una célula oval y la expresión de TGF- $\alpha$  es un factor importante para inducir la canceración de la célula oval. Además, se sugiere una probabilidad de que TGF- $\alpha$  expresado en exceso en tejidos con hepatitis/cirrosis que rodean células ovales promueva la canceración de células ovales mediante los receptores. Por tanto, la supresión de la expresión de TGF- $\alpha$  en tejidos con hepatitis/cirrosis, además de la reducción de la expresión de TGF- $\alpha$  en células ovales observada en hepatitis crónica por virus, se considera que es un mecanismo extremadamente importante que desactiva la célula oval ya que es un célula precursora de hepatoma y conduce al control de una oncogénesis hepática.

- 10 Como se ha explicado anteriormente, el TGF- $\alpha$  está estrechamente asociado a la transformación de células de hepatitis y cirrosis, y con oncogénesis en un hígado y alteración maligna de células de hepatoma. Por consiguiente, es altamente probable que un control de TGF- $\alpha$  expresado en exceso en células de tejido hepático y células ovales en el hígado pueda conducir a la supresión de la transformación de células de hepatitis y cirrosis, y a la supresión de la oncogénesis en el hígado y alteración maligna a células de hepatoma.

- 15 El ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico (código de desarrollo "NIK-333"), una clase de compuesto de poliprenilo, es conocido por tener afinidades por proteína de unión a ácido retinoico y receptores de ácido retinoico, además de una acción para inducir la diferenciación y apoptosis en células de hepatoma. Clínicamente se ha informado que NIK-333 suprimió significativamente la reaparición después de la cura radical de hepatoma por una administración a largo plazo durante un año, que revela que la sustancia tiene una acción inhibidora contra la reaparición de hepatoma. Además, durante la administración anterior, casi no se observa efecto secundario tal como disfunción de hígado y aquellos con otros retinoides, así NIK-333 es un medicamento seguro (N. Eng. J. Med. 334, 1561-1567 (1996)).

- 20 El documento Muto Y. y col. "Antitumor activity of a novel synthetic compound polyprenoic-acid derivative", DERMATOLOGICA, vol 169 n° 4, página 241 (1984)) describe la actividad antitumoral de un novedoso compuesto sintético ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico que es un derivado de ácido poliprenoico y llamado E-5166 en la referencia. La referencia describe que el compuesto tiene un efecto inhibidor *in vivo* sobre el desarrollo de papilomas de piel en ratones y carcinomas hepatocelulares inducidos por  $\gamma$ -metil DAB en ratas, además de en hepatoma espontáneo de ratones. Los autores llegan a la conclusión de que una deficiencia local de la vitamina A desempeña una función en el desarrollo temprano de cáncer.

El documento no describe que el compuesto de poliprenilo pueda usarse como inhibidor contra la expresión de TGF- $\alpha$  en una célula de tejido hepático transformada por un carcinógeno químico hepático.

- 25 El documento Muto Y. ("Chemoprevention of heptoma with polyprenoic acids" Symposia and free communications, volúmenes 1, 2, 3, página 847 (1986)) describe la quimioprevención de hepatoma con ácido poliprenoico. Se desvela en la referencia que la administración por vía oral de TNCP (análogos de tetrametilmetoxifenilo de ácido retinoico) y ácido poliprenoico redujeron significativamente las incidencias tumorales de hepatomas experimentales inducidos por carcinógeno químico en ratas, además de en ratones que llevan hepatoma espontáneo genéticamente determinado.

La referencia no describe que el compuesto de poliprenilo pueda usarse como inhibidor contra la expresión de TGF- $\alpha$  en célula de tejido hepático transformada por carcinógeno químico hepático.

- 35 Ya se ha informado que un compuesto de poliprenilo inhibe la expresión de TGF- $\alpha$  en una célula de hepatoma establecida (Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 100-104 (1996)). Sin embargo, es totalmente desconocido que, en un tejido hepático *in vivo*, un compuesto de poliprenilo inhiba TGF- $\alpha$  cuya expresión es promovida en el tejido hepático por la administración de un carcinógeno químico hepático, y que el compuesto suprima la expresión de TGF- $\alpha$  en una célula oval que se considera una célula precursora de hepatoma.

- 40 Divulgación de la invención

Así, un objetivo de la presente invención es proporcionar un inhibidor contra la transformación de células de hepatitis y/o de cirrosis inhibiendo la expresión de TGF- $\alpha$ , y un inhibidor contra la oncogénesis en un hígado y un inhibidor contra la alteración maligna de carcinoma.

- 45 Los inventores de la presente invención han realizado diversas investigaciones para encontrar un inhibidor contra la transformación de células de hepatitis y/o cirrosis (un inhibidor contra la alteración maligna de hepatitis o cirrosis), un inhibidor contra la oncogénesis y un inhibidor contra la alteración maligna de carcinoma en el hígado. Como resultado, encontraron que un compuesto de poliprenilo inhibe la expresión de TGF- $\alpha$  en células de tejido hepático transformadas por un carcinógeno químico hepático y la expresión de TGF- $\alpha$  en una célula oval que es fuertemente sugerida como una

posible célula precursora de un hepatoma.

Así, la presente invención proporciona:

- 5 (1) Un ácido poliprenilcarboxílico como principio activo para su uso en la inhibición de la aparición, reaparición (segunda oncogénesis) y alteración maligna de hepatoma que inhibe la expresión de TGF- $\alpha$  en una célula de tejido hepático transformada por un carcinógeno químico hepático, en el que el ácido poliprenilcarboxílico es ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico.
- (2) Un compuesto de poliprenilo según (1), en el que el ácido poliprenilcarboxílico es ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico.
- (3) Un compuesto de poliprenilo según (1) o (2), en el que la célula de tejido hepático es una célula oval.
- 10 (4) Un compuesto de poliprenilo según una cualquiera de (1) a (3), que se usa para inhibir la transformación de una célula de hepatitis y/o cirrosis.
- (5) Un compuesto de poliprenilo según una cualquiera de (1) a (4), que está en una forma de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (6) Un compuesto de poliprenilo según (5), que es una composición farmacéutica para administración por vía oral.
- 15 El ácido poliprenilcarboxílico según la presente invención, es decir, ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico es para administración a un mamífero que incluye ser humano.

Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 muestra una fotografía de un tejido hepático de un animal no tratado. No se observa expresión de células ovales positivas para TGF- $\alpha$ .

- 20 La Fig. 2 es una fotografía de células ovales expresadas en un tejido hepático de un grupo de control (administrado solo con 3'-MeDAB como carcinógeno químico hepático) que dan una observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva en el citoplasma (las áreas teñidas con color marrón fuerte indican expresiones de TGF- $\alpha$ ).

- La Fig. 3 es una fotografía que muestra que células ovales expresadas con 3'-MeDAB dan observación de TGF- $\alpha$  débilmente positiva por la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333 (las áreas teñidas con color marrón fuerte son más pequeñas que aquellas en la Fig. 2), que indica una expresión reducida de TGF- $\alpha$ .
- 25

La Fig. 4 muestra una fotografía de un tejido hepático de un animal no tratado. Casi no se observa expresión de TGF- $\alpha$ .

La Fig. 5 es una fotografía que muestra la expresión de TGF- $\alpha$  en un tejido hepático no tumoral de un grupo de control (administrado solo con DEN como carcinógeno químico hepático). Los tejidos hepáticos que rodean la vena central dan observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva (las áreas teñidas con color marrón fuerte indican expresiones de TGF- $\alpha$ ).

- 30 La Fig. 6 es una fotografía que muestra que se encuentra que el TGF- $\alpha$  expresado con DEN en tejidos hepáticos que rodean la vena central es casi negativo por la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333 (casi no se observa área teñida con color marrón fuerte).

La Fig. 7 muestra una fotografía de un tejido hepático de un animal no tratado. Casi no se observa expresión de TGF- $\alpha$ .

- La Fig. 8 es una fotografía que muestra la expresión de TGF- $\alpha$  por administración de DEN en tejidos hepáticos no tumorales de un grupo de control. Los tejidos hepáticos que rodean la vena central dan observaciones de TGF- $\alpha$  fuertemente positivas (las áreas teñidas con color marrón fuerte indican expresiones de TGF- $\alpha$ ).
- 35

La Fig. 9 es una fotografía que muestra que se encuentra que el TGF- $\alpha$  expresada con DEN en tejidos hepáticos que rodean la vena central es casi negativo por la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333 (casi no se observa área teñida con color marrón fuerte).

- 40 La Fig. 10 muestra una fotografía de un tejido hepático de un animal no tratado. No se observa la expresión de células ovales positivas para TGF- $\alpha$ .

La Fig. 11 es una fotografía que muestra que células ovales expresadas en un tejido hepático de un grupo de control por administración de 3'-MeDAB dan observaciones de TGF- $\alpha$  fuertemente positivas en el citoplasma (las áreas teñidas con color marrón fuerte indican expresiones de TGF- $\alpha$ ).

- 45 La Fig. 12 es una fotografía que muestra que el número de células ovales con observación de TGF- $\alpha$  fuertemente

positiva, expresadas con 3'-MeDAB, se reduce por la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333 (el número de células teñidas con color marrón fuerte es inferior al de en la Fig. 11).

La Fig. 13 muestra una fotografía de un tejido hepático de un animal no tratado. No se observan células que den observaciones de TGF- $\alpha$  positivas evidentes.

- 5 La Fig. 14 es una fotografía que muestra que células ovals expresadas por la administración de clorhidrato de D-galactosamina en un tejido hepático de un grupo de control dan observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva en el citoplasma (las áreas teñidas con color marrón fuerte indican expresiones de TGF- $\alpha$ ).

La Fig. 15 es una fotografía que muestra que células ovals expresadas con clorhidrato de D-galactosamina dan observación de TGF- $\alpha$  débilmente positiva por la administración de 200 mg/kg/día de NIK-333 (las áreas teñidas con color marrón fuerte son más pequeñas que aquellas en la Fig. 14), que revela reducción de la expresión de TGF- $\alpha$ .

Mejor modo para llevar a cabo la invención

El compuesto de poliprenilo usado en la presente invención es ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico. Un ejemplo del compuesto más preferible incluye ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico (NIK-333).

- 15 Un compuesto de poliprenilo usado en la presente invención puede prepararse mediante un procedimiento conocido (publicación de patente japonesa (Kohyo) No. 63-32058 (1988), J. Chem. Soc. (C), 2154, 1966).

Como inhibidor contra la expresión de TGF- $\alpha$  de la presente invención, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de poliprenilo para su uso según la presente invención se prepara generalmente, y se administra por vía oral o parenteralmente cualquiera que sea adecuada. Ejemplos de formulaciones de la composición farmacéutica adecuadas para administración por vía oral incluyen comprimidos, gránulos, cápsulas, cápsulas blandas, píldoras, polvos y líquidos. Ejemplos de formulaciones de la composición farmacéutica adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones y supositorios. Estas composiciones farmacéuticas pueden prepararse usando un compuesto de poliprenilo como se define en la reivindicación 1 o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y uno o más vehículos farmacéuticos según un procedimiento corriente.

- 25 Por ejemplo, para un medicamento adecuado para administración por vía oral, una composición farmacéutica deseada puede prepararse usando, como vehículo farmacéutico, excipientes tales como lactosa, glucosa, almidón de maíz, sacarosa; disgregantes tales como carboximetilcelulosa de calcio e hidroxipropilcelulosa; lubricantes tales como estearato de calcio, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol y aceite hidrogenado; aglutinantes tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), gelatina, goma arábiga; agentes humectantes tales como glicerol y etilenglicol; y además, tensioactivos y aromatizantes, si fuera necesario.

Para un medicamento adecuado para administración parenteral, diluyentes tales como agua, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, agar y goma tragacanto pueden usarse como vehículo farmacéutico. Pueden usarse agentes solubilizantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes de tamponamiento, agentes isotonzantes, conservantes, agentes relajantes o similares, si fuera necesario.

- 35 Una dosis del inhibidor contra la expresión de TGF- $\alpha$  de la presente invención no está particularmente limitada. Por ejemplo, la dosis para administración por vía oral puede ser 50-1200 mg, preferentemente 300-900 mg por día para un adulto, y la dosis para administración parenteral puede ser 1-1200 mg, preferentemente 5-900 mg por día para un adulto. Pueden esperarse acciones inhibitorias deseadas por la administración de cada una de las dosis anteriores una vez o 2 a 3 veces como porciones divididas.

#### 40 Ejemplos

La presente invención se explicará en más detalle con referencia a los ejemplos. En los siguientes ejemplos, ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico (denominado en lo sucesivo "NIK-333") se usó como compuesto de poliprenilo.

#### Ejemplo 1

- 45 Efectos sobre la inducción de células ovals positivas para TGF- $\alpha$  de una rata mediante tratamiento con 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno (3'-MeDAB) como carcinógeno químico hepático

Se usaron ratas Fischer macho (F344/N Slc, 6 semanas de edad) como animal, y las ratas se administraron con pienso sólido preparado para contener un carcinógeno químico hepático 3'-MeDAB en una relación del 0,06 % durante cuatro semanas para inducir células ovals. NIK-333 se suspendió en aceite de soja, y una dosis de 80 mg/kg se administró por vía oral administrada a cada rata durante cuatro semanas (una vez/un día) junto con la administración de 3'-MeDAB. A un

grupo de control se administró aceite de soja (5 ml/kg) por vía oral. Después de 4 semanas desde el inicio de la administración de 3'-MeDAB, los hígados se extirparon bajo anestesia. Los hígados se sometieron a fijación en 10 % de formalina e incorporación en parafina, y adicionalmente a tinción inmunológica usando un anticuerpo anti-TGF- $\alpha$ . Los niveles de expresión de TGF- $\alpha$  se analizaron bajo microscopio.

5 Las Figs. 1 a 3 son fotografías que muestran efectos inhibidores sobre la inducción de células ovas positivas para TGF- $\alpha$  inducidas por la administración de cuatro semanas de 3'-MeDAB, cuando se administraron simultáneamente 80 mg/kg/día de NIK-333 durante cuatro semanas (tinción inmunohistológica usando el anticuerpo anti TGF- $\alpha$ ). Se obtuvieron observaciones similares en otros animales que se analizaron al mismo tiempo.

10 La Fig. 1 muestra una fotografía de un tejido hepático de un animal no tratado. No se observa expresión de células ovas que sean positivas para TGF- $\alpha$ .

La Fig. 2 muestra una observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva en el citoplasma de células ovas expresadas en un tejido hepático del grupo de control (administrado solo con 3'-MeDAB).

La Fig. 3 muestra que células ovas expresadas con 3'-MeDAB dieron observación de TGF- $\alpha$  débilmente positiva por la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333, que indica una expresión de TGF- $\alpha$  reducida.

15 En el mismo experimento se fotografiaron otras porciones, y los resultados se obtuvieron como se muestra en las Figs. 10 a 12.

La Fig. 10 muestra un tejido hepático de un animal no tratado. No se observa la expresión de células ovas que sean positivas para TGF- $\alpha$ .

20 La Fig. 11 muestra una observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva en el citoplasma de células ovas expresadas por administración de 3'-MeDAB en un tejido hepático del grupo de control.

La Fig. 12 muestra que el número de células ovas con observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva, expresada con 3'-MeDAB, se redujo por la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333.

#### Ejemplo 2

25 Efectos sobre la expresión de TGF- $\alpha$  en un tejido hepático no tumoral de una rata después de la administración de N-nitrosodietilamina (DEN) como carcinógeno químico hepático

30 Se usaron ratas Fischer macho (F344/N Slc, 6 semanas de edad) como animal, y las ratas se administraron con un carcinógeno químico hepático DEN durante 5 semanas en forma de agua de beber (concentración: 40 ppm), y luego se criaron con agua de beber normal durante 15 semanas sucesivas para inducir el carcinoma hepatocelular. NIK-333 se suspendió en aceite de soja, y una dosis de 80 mg/kg se administró por vía oral a cada rata durante 14 semanas (una vez/un día) a partir de una semana después del fin de la administración de DEN. A un grupo de control se administró aceite de soja (5 ml/kg) por vía oral. Después de 20 semanas desde el inicio de la administración de DEN, los hígados se extirparon bajo anestesia. Los hígados se sometieron a fijación en 10 % de formalina e incorporación en parafina, y adicionalmente a tinción inmunológica usando un anticuerpo anti-TGF- $\alpha$ . Los niveles de expresión de TGF- $\alpha$  se analizaron bajo microscopio.

35 Las Figs. 4 a 6 son fotografías que muestran efectos inhibidores sobre la expresión de TGF- $\alpha$  en un tejido hepático no tumoral, cuando la administración se cesó durante una semana después del tratamiento de 5 semanas con DEN, y luego se administraron 80 mg/kg/día de NIK-333 durante 14 semanas (tinción inmunohistológica usando un anticuerpo anti-TGF- $\alpha$ ). Se obtuvieron observaciones similares en otros animales que se analizaron al mismo tiempo.

La Fig. 4 muestra un tejido hepático de un animal no tratado. Casi no se observó expresión de TGF- $\alpha$ .

40 La Fig. 5 muestra la expresión de TGF- $\alpha$  en un tejido hepático no tumoral del grupo de control (administrado solo con DEN). Se observó expresión de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva en el tejido hepático que rodea la vena central.

La Fig. 6 muestra resultados de observaciones de TGF- $\alpha$  casi negativas después de la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333, cuyo TGF- $\alpha$  se expresó por DEN en tejidos hepáticos que rodean la vena central.

45 En el mismo experimento se fotografiaron otras porciones, y los resultados se obtuvieron como se muestra en las Figs. 7 a 9.

La Fig. 7 muestra un tejido hepático de un animal no tratado. Casi no se observó expresión de TGF- $\alpha$ .

La Fig. 8 muestra la expresión de TGF- $\alpha$  por administración de DEN en tejidos hepáticos no tumorales del grupo de

control. El tejido hepático que rodea la vena central dio una observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva.

La Fig. 9 muestra resultados de observaciones casi negativas de TGF- $\alpha$  después de la administración de 80 mg/kg/día de NIK-333, cuyo TGF- $\alpha$  se expresó por DEN en tejidos hepáticos que rodean la vena central.

### Ejemplo 3

#### 5 Efectos sobre la expresión de TGF- $\alpha$ en células ovas en una rata inducida por clorhidrato de D-galactosamina

Se usaron ratas SD macho (Crj/CD (SD), 6 semanas de edad) como animal, y clorhidrato de D-galactosamina (5 ml/kg) preparado como 200 mg/ml con solución salina fisiológica se administró intraperitonealmente una vez a cada rata para inducir células ovas. NIK-333 se suspendió en aceite de soja, y una dosis de 200 mg/kg se administró por vía oral a cada rata durante 1 a 6 días. Al grupo de control se administró aceite de soja (2 ml/kg) por vía oral. A partir del día siguiente hasta 7 días después del inicio de la administración, los hígados se extirparon bajo anestesia con el paso del tiempo. Los hígados se sometieron a fijación en 10 % de formalina e incorporación en parafina, y adicionalmente a tinción inmunológica usando un anticuerpo anti-TGF- $\alpha$ . Los niveles de expresión de TGF- $\alpha$  se analizaron bajo microscopio.

Las Figs. 13 a 15 son fotografías que muestran efectos inhibidores sobre la expresión de TGF- $\alpha$  en células ovas inducida por la administración de clorhidrato de D-galactosamina, cuando se administraron 200 mg/kg/día de NIK-333 durante cuatro días (tinción inmunohistológica usando un anticuerpo anti-TGF- $\alpha$ ). Se obtuvieron observaciones similares en otros animales que se analizaron al mismo tiempo.

La Fig. 13 muestra un tejido hepático de un animal no tratado. No se encontraron células que mostraran una observación positiva de TGF- $\alpha$  evidente.

La Fig. 14 muestra un resultado de una observación de TGF- $\alpha$  fuertemente positiva en el citoplasma de células ovas expresado por la administración de clorhidrato de D-galactosamina en un tejido hepático del grupo de control.

La Fig. 15 muestra un resultado de observación de TGF- $\alpha$  débilmente positiva de células ovas expresadas por clorhidrato de D-galactosamina por la administración de 200 mg/kg/día de NIK-333, que indica reducción de la expresión de TGF- $\alpha$ .

### Aplicabilidad industrial

25 Un compuesto de poliprenilo como se define en la reivindicación 1 inhibe la transformación de una célula de hepatitis o una célula de cirrosis transformada por un carcinógeno químico hepático, o TGF- $\alpha$ , que participa en oncogénesis o alteración maligna de células tumorales en un hígado. Por tanto, un compuesto de poliprenilo como se define en la reivindicación 1 puede usarse como inhibidor contra la transformación de una célula de hepatitis o una célula de cirrosis transformada por un carcinógeno químico hepático, como inhibidor contra la alteración maligna de hepatitis o cirrosis, y es útil como inhibidor contra la aparición, reaparición (segunda oncogénesis) y alteración maligna de carcinoma en un hígado.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ácido poliprenilcarboxílico como principio activo para su uso en la inhibición de la aparición, reaparición (segunda oncogénesis) y alteración maligna de hepatoma inhibiendo la expresión de TGF- $\alpha$  en una célula de tejido hepático transformada por un carcinógeno químico hepático, en el que el ácido poliprenilcarboxílico es ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico.
2. Un compuesto de poliprenilo para su uso según la reivindicación 1, en el que el ácido poliprenilcarboxílico es ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoico.
3. Un compuesto de poliprenilo para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula de tejido hepático es una célula oval.
- 10 4. Un compuesto de poliprenilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se usa para inhibir la transformación de una célula de hepatitis y/o cirrosis.
5. Un compuesto de poliprenilo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está en forma de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. Un compuesto de poliprenilo para su uso según la reivindicación 5, que es una composición farmacéutica para administración por vía oral.



Fig. 1

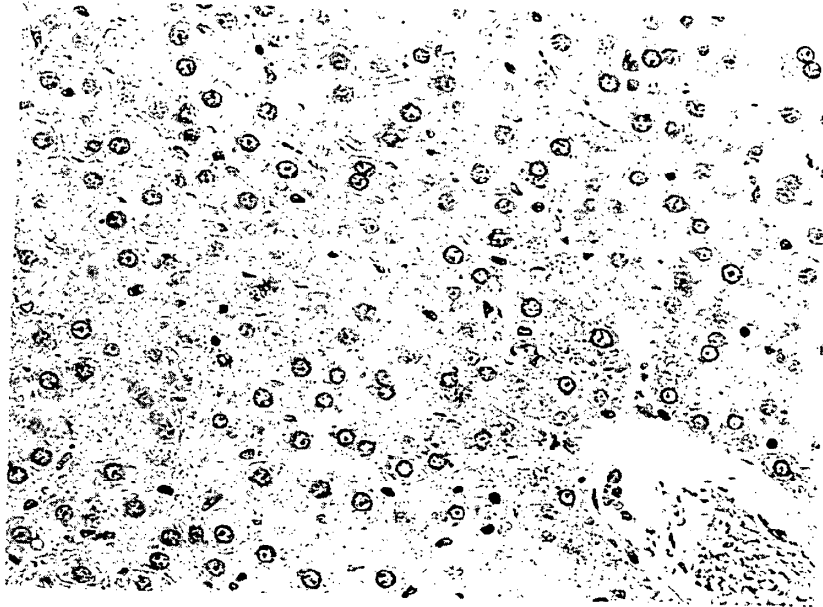


Fig. 2

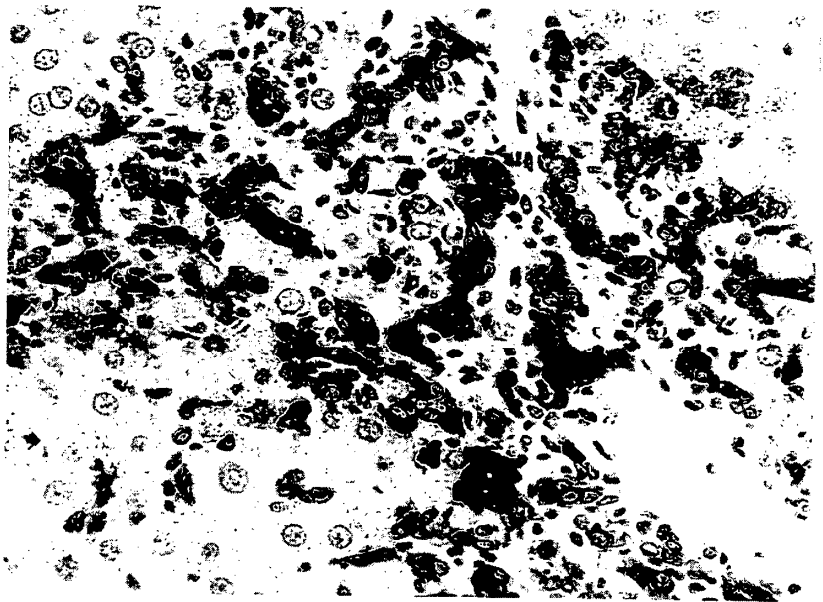


Fig. 3

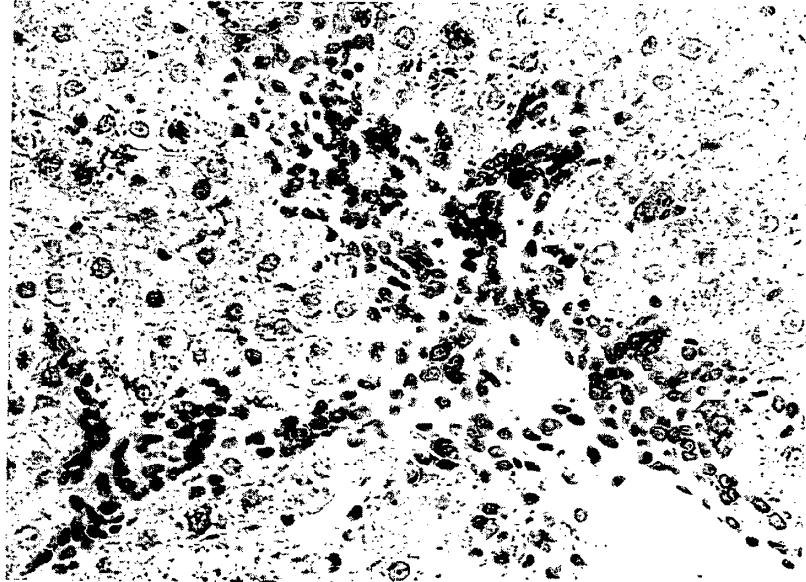


Fig. 4

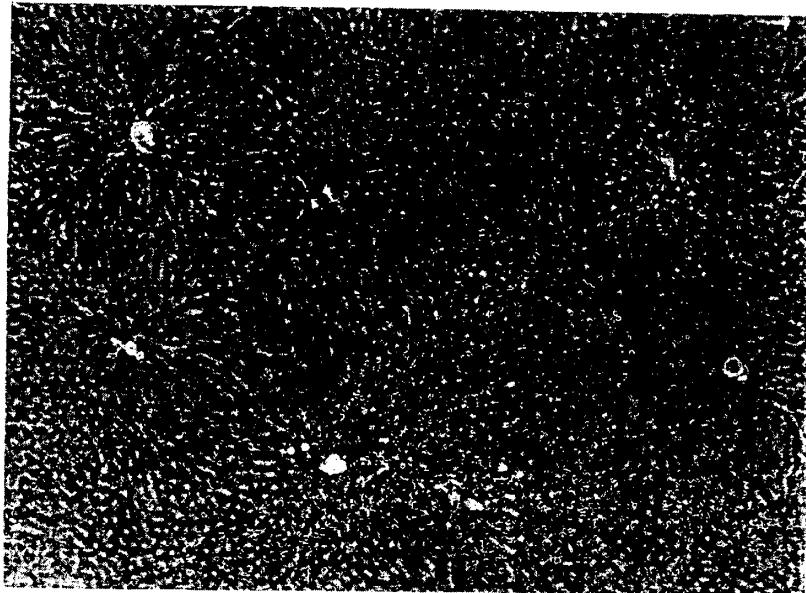


Fig. 5

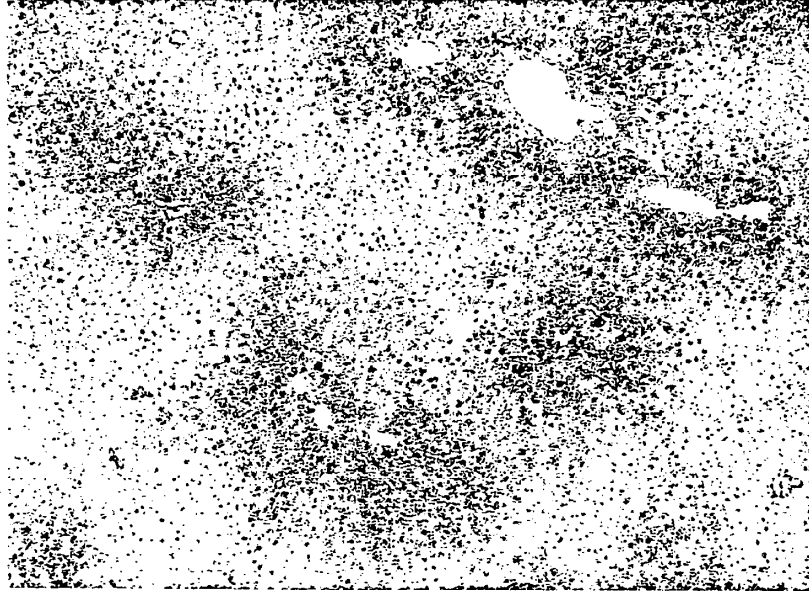


Fig. 6

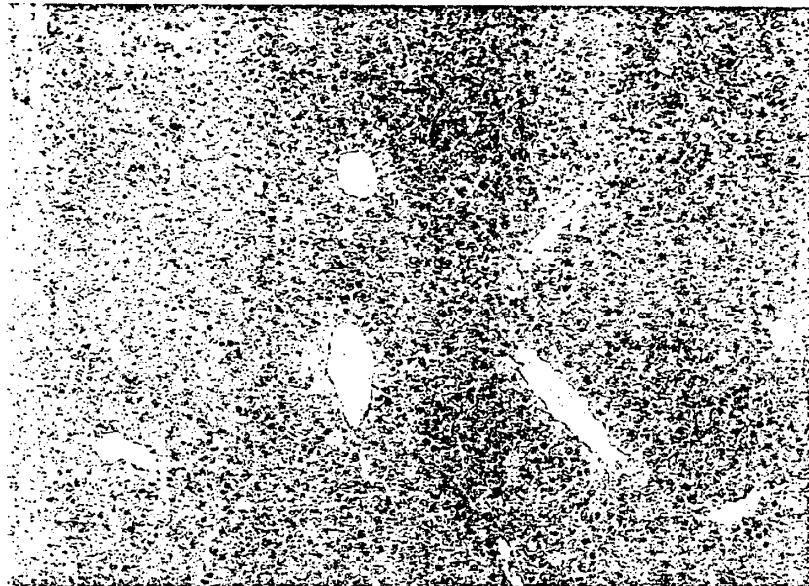


Fig. 7

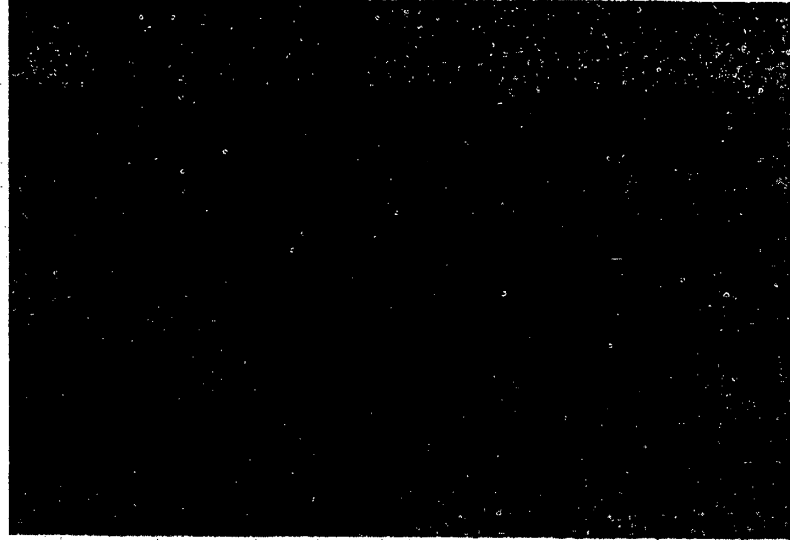


Fig. 8

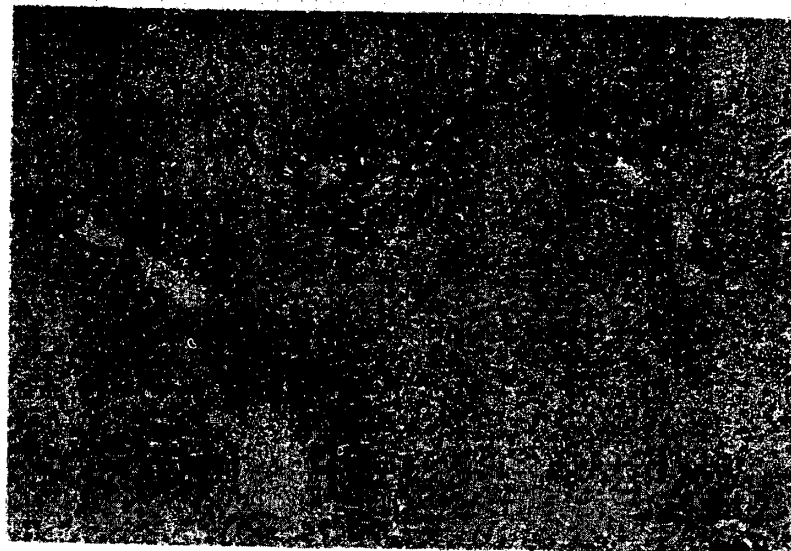


Fig. 9

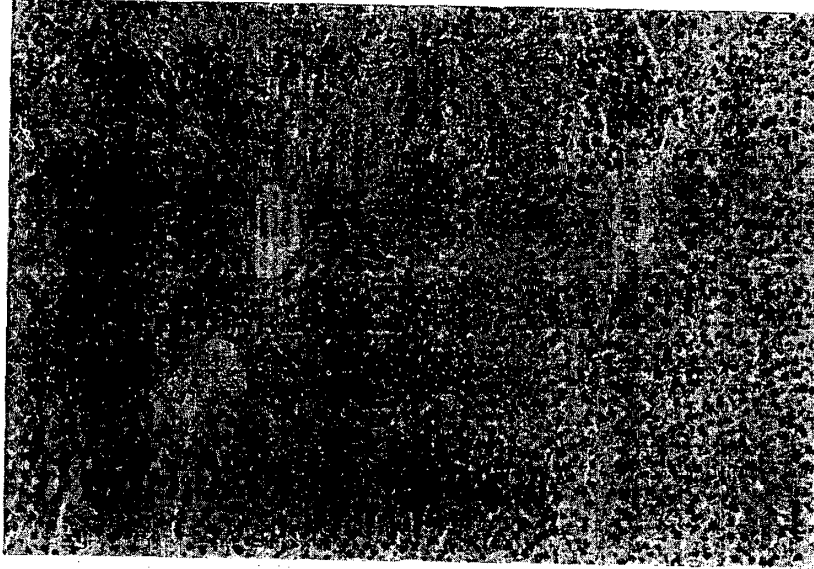


Fig. 10



Fig. 11

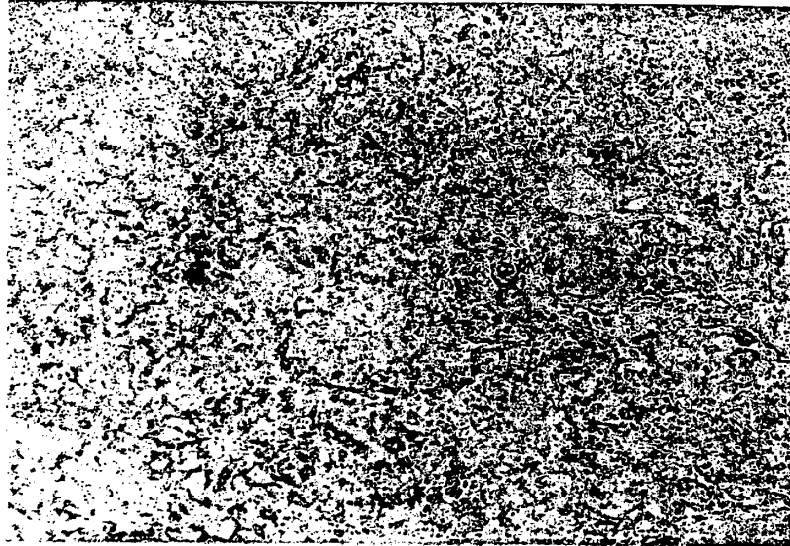


Fig. 12

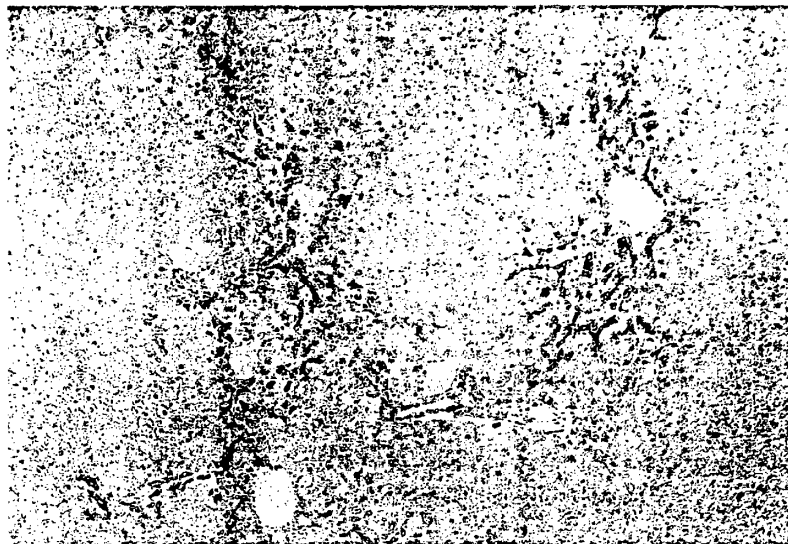


Fig. 13



Fig. 14

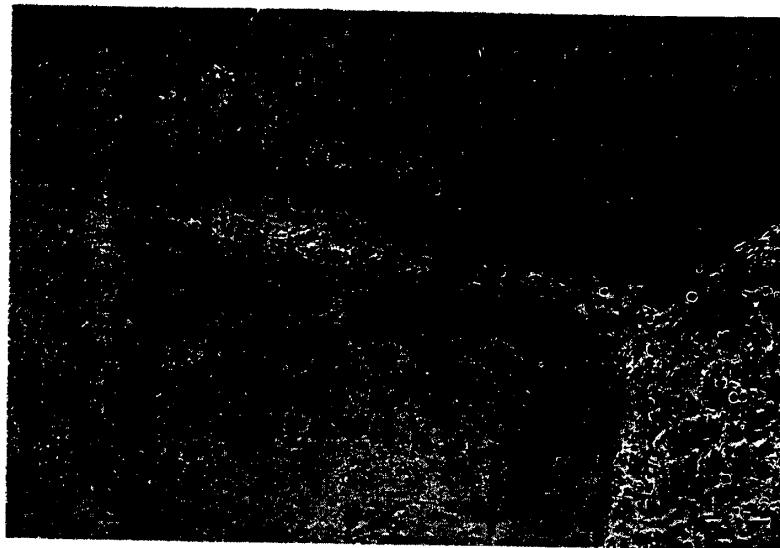


Fig. 15

