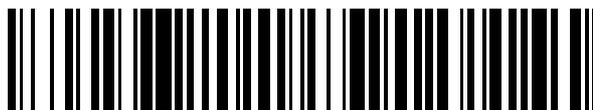


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 361**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2004 E 04793012 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 1685846**

54 Título: **Agente antitumoral**

30 Prioridad:

04.11.2003 JP 2003375021

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

09.02.2015

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUZAWA, YUJI;
FUNAHASHI, TOHRU y
TAMURA, SHINJI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 528 361 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

Agente antitumoral

Campo técnico

La presente invención se refiere a agentes antitumorales, particularmente a agentes antitumorales hepáticos.

5 Técnica antecedente

La adiponectina es una proteína específica para el tejido adiposo animal que se separó por primera vez de tejido adiposo humano por Maeda y col. en 1996 (Maeda y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 221:286, 1996). La adiponectina está presente en abundancia en la sangre así como en el tejido adiposo, encontrándose a una concentración tan alta como de 5 a 10 µg/ml en sangre humana normal (Arita y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 257:79-83, 1999).

Se sabe que los pacientes con obesidad tienen una alta prevalencia de cáncer y una concentración reducida de adiponectina en sangre (Arita y col., anteriormente citado). La adiponectina en sangre ha mostrado anteriormente que tiene los efectos de inhibir la proliferación de monocitos y linfocitos B (Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública N° 2000-256208) y de suprimir la activación de las células estrelladas hepáticas y la producción de matrices extracelulares (Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública N° 2002-363094). Sin embargo, la relación entre la concentración de adiponectina en sangre y la enfermedad en pacientes obesos no se ha demostrado suficientemente.

El documento WO03/062275 desvela el uso de adiponectina para tratar los síntomas de tumores sólidos o cáncer, y para tratar enfermedades hepáticas. Xu A. W. y col., J.Clin Invest, vol 112, n° 1 (julio de 2003) páginas 91-100 desvela el uso de adiponectina para tratar determinadas enfermedades hepáticas. El documento WO02/072149 desvela el uso de adiponectina para tratar la obesidad.

Por lo tanto, como resultado del avance adicional de una investigación y estudio referente a la relación entre la concentración de adiponectina en sangre y enfermedad, la presente invención se completó descubriendo que la concentración reducida de adiponectina en sangre promueve la carcinogénesis en el hígado.

Divulgación de la invención

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere a:

(1) el uso de adiponectina en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un tumor hepático;

(2) el uso de acuerdo con (1), en el que dicho medicamento está en la forma de una inyección; y

30 (3) el uso de acuerdo con (1) o (2), en el que la dosificación de dicha adiponectina es de 1 a 100 mg/kg/día por paciente adulto.

El tumor diana es un tumor hepático; la adiponectina se administra preferentemente en la forma de una inyección; y la dosificación es de 1 a 100 mg/kg/día por paciente adulto.

35 De acuerdo con la invención, se proporciona un nuevo agente antitumoral que puede aplicarse clínicamente con fines profilácticos y terapéuticos contra el tumor hepático, así como se espera que este inhiba la carcinogénesis en el hígado.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un ejemplo de cada una de las fotografías que muestran una imagen general del hígado después de 6 meses de administración de una dieta DCAA. El desarrollo de cirrosis y cáncer del hígado se observó en ratones KO, mientras que todos los ratones de TS desarrollaron solamente hígado graso (ratones control);

40 La Figura 2 es un conjunto de histologías hepáticas mediante tinción de HE después de 6 meses de la administración de la dieta DCAA. Se descubrió infiltración de células inflamatorias, además del hígado graso, en los ratones KO, mientras que solamente se observó una imagen de hígado graso pronunciado en los ratones de TS;

45 La Figura 3 es un conjunto de histologías hepáticas mediante tinción con Rojo Sirio después de 6 meses de administración de la dieta DCAA. Se observó un alto grado de fibrilación acompañado por la formación de puentes en el área portal de los ratones KO, mientras que se observó solamente una fibrilación mínima en los ratones de TS;

50 La Figura 4 es un conjunto de histologías de un tumor hepático de un ratón KO mediante tinciones con HE y Rojo Sirio después de 6 meses de administración de la dieta DCAA. Este tumor mostró una imagen de un carcinoma bien diferenciado de células adiposas hepáticas acompañado por una marcada degeneración grasa;

La Figura 5 es una gráfica que muestra las concentraciones de peróxido lipídico en sangre después de 6 meses de administración de la dieta DCAA. Se observó que la concentración de peróxido lipídico estaba elevada

significativamente en ratones KO en comparación con la de los ratones de TS (ratones control); y
 La Figura 6 es una gráfica que muestra las concentraciones de peróxido lipídico después de 6 meses de
 administración de la dieta DCAA. Se observó que la concentración de peróxido lipídico estaba elevada
 significativamente en ratones KO en comparación con la de los ratones de TS (ratones control), pero no se observó
 ninguna diferencia entre el hígado tumoral y el hígado normal en ratones KO.

Mejor modo de realización de la invención

La adiponectina es una proteína que se produce en el tejido adiposo de animales, incluyendo seres humanos, y está
 presente en abundancia en la sangre. La adiponectina humana altamente purificada se ha obtenido del ADNc que
 codifica esta proteína por un procedimiento recombinante (Arita y col., anteriormente citado). La secuencia de
 nucleótidos del ADNc para la adiponectina humana se ha registrado en GenBank con el Número de Acceso D45371.

También, se cree que una sustancia denominada ACRP30, clonada a partir de células 3T3-F442A (Scherer. P E, y
 col., J. Biol. Chem. 270:26746-26749 (1995)), es la misma entidad que la adiponectina. Esta sustancia también se ha
 obtenido con una pureza elevada mediante una técnica que usa el gen recombinante de la misma y se puede usar del
 mismo modo que la anterior. Las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una delección,
 sustitución, o adición de uno o varios aminoácidos y que tienen actividad antitumoral también se encuentran dentro de
 la adiponectina de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, "actividad antitumoral" se refiere a una actividad para inhibir la
 proliferación del cáncer, una actividad para reducir el cáncer, y/o una actividad para prevenir el desarrollo del cáncer. A
 este respecto, cáncer y tumor se usan indistintamente en el presente documento.

El sujeto al cual se administrará el agente antitumoral de acuerdo con la invención no está restringido, pero en
 particular, es adecuado un paciente con alto riesgo de desarrollar un tumor hepático, tal como un paciente obeso.
 También es útil la administración a un paciente que ya ha desarrollado un tumor hepático, ya que este puede suprimir
 la progresión del tumor hepático. Los tumores a los que se dirige la administración pueden ser benignos o cáncer de
 hígado maligno (tumor hepático).

Puede administrarse un agente antitumoral de acuerdo con la invención sistémica o localmente. La administración
 sistémica incluye tratamientos parenterales tales como intravenosos, subcutáneos, e inyecciones intramusculares,
 administración oral y similares, y también pueden emplear el procedimiento de producir adiponectina de forma
 sustancial en el cuerpo, por ejemplo, a través de la denominada terapia génica.

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención incluyen soluciones tales como inyecciones,
 preparaciones sólidas tales como polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas y supositorios y similares.

Las composiciones preparadas para la administración parenteral a seres humanos incluyen inyecciones, supositorios
 y similares. Cuando se preparan en forma de una inyección, la composición puede usar, por ejemplo, disolventes
 (agua destilada para inyección, etc.), agentes estabilizantes (edetato de sodio, etc.), agentes tonificantes (cloruro de
 sodio, glicerina, manitol, etc.), ajustadores de pH (ácido clorhídrico, ácido cítrico, hidróxido sódico, etc.) y agentes de
 suspensión (metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etc.) y cuando se prepara en forma de supositorios, pueden
 usar selectivamente, por ejemplo, bases de supositorios (manteca de cacao, macrogol, etc.) y similares de manera
 adecuada.

Las composiciones administradas por vía oral a seres humanos incluyen, por ejemplo, polvos, gránulos, comprimidos,
 cápsulas, jarabes, soluciones, y similares. Cuando se fabrican, por ejemplo, en la forma de un polvo, gránulo, o
 comprimido, la composición puede usar cualquier vehículo farmacéutico adecuado para fabricar composiciones
 sólidas, por ejemplo, un excipiente (almidón, almidón de maíz, glucosa, fructosa, sacarosa, etc.), lubricante (estearato
 de magnesio, etc.), disgregante (almidón, celulosa cristalina, etc.), aglutinante (almidón, goma arábiga, etc.) o
 similares, y puede recubrirse con agentes de recubrimiento adecuados (gelatina, sacarosa, goma arábiga, cera de
 carnauba, etc.), agentes de recubrimiento entérico (por ejemplo, acetato ftalato de celulosa, copolímero de metacrilato,
 ftalato de hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.), o similares. Como agentes de recubrimiento para
 preparaciones de liberación sostenida (preparaciones LS) se pueden usar, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa,
 hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polioxietilenglicol, Tween 80, Pluronic F68, acetato ftalato de celulosa,
 ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroximetilcelulosa, Eudragit (copolímero de
 metacrilato-acrilato de Rohm Co., Ltd., Alemania), y similares. Cuando se elabora en cápsulas, dicha composición se
 envasa después de mezclarse uniformemente con excipientes apropiados, por ejemplo, estearato de magnesio,
 estearato cálcico, talco, ácido silícico anhidro ligero, o similares para potenciar la fluidez y lubricidad, celulosa
 cristalina, lactosa, o similares para la fluidez a presión, y en caso necesario, los disgregantes anteriormente descritos,
 o después de elaborar la mezcla en una forma granular, o después de aplicar el recubrimiento a los gránulos usando
 un agente de recubrimiento adecuado, o también después de someter a la mezcla o gránulos a moldeado de
 encapsulación con una base de cápsula adecuada (gelatina, etc.) a la que se han añadido glicerina, sorbitol, o
 similares para aumentar la plasticidad. A estas cápsulas se les puede añadir opcionalmente un colorante, un
 conservante (dióxido de azufre, parabenos (metil, etil o propil parahidroxibenzoato, etc.)), y similares. Además de una
 cápsula común, la cápsula puede ser una cápsula que tenga un recubrimiento entérico, una cápsula resistente a los

5 jugos gástricos, o una cápsula de liberación controlada. Cuando se elaboran en cápsulas de recubrimiento entérico, pueden envasarse liposomas recubiertos con un agente de recubrimiento entérico en una cápsula común, o una cápsula en sí misma puede recubrirse con el agente de recubrimiento entérico o moldearse usando un polímero entérico como su base. Además, cuando la composición se prepara en la forma de una jarabe o solución, por ejemplo, pueden usarse de manera selectiva estabilizantes (edetato de sodio, etc.), agentes de suspensión (goma arábiga, 5 carmelosa, etc.), agentes saborizantes (jarabe simple, glucosa, etc.), aromatizantes, y similares de manera adecuada.

10 La dosificación varía dependiendo del tipo de enfermedad, del sexo y de la edad de un paciente, de la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración, de la vía de administración, y similares, pero, en el caso de inyección intravenosa para inhibir la carcinogénesis hepática, esta es de 1 a 100 mg/kg/día, preferentemente de 3 a 20 mg/kg/día por paciente adulto. La administración se lleva a cabo preferentemente ajustando la dosificación de acuerdo con la concentración en sangre de adiponectina en un sujeto, y puede realizarse una vez al día, o de dos a tres veces al día en dosis divididas.

Ejemplo 1

15 La presente invención se describe de manera concreta a continuación, basándose en un Ejemplo de Ensayo y Ejemplos de formulación.

Ejemplo de ensayo

1. Materiales y procedimientos

20 Se llevó a cabo un ensayo usando ratones modificados genéticamente ("*knockout*") con adiponectina de 8 semanas de edad (en lo sucesivo citados como "ratones KO") como animales de ensayo, y ratones normales de 8 semanas de edad como animales control. Los ratones KO se prepararon de acuerdo con el procedimiento de Maeda y col. (Maeda N, y col., Nat. Med. 8:731-732, 2002).

25 El ensayo se realizó como se describe a continuación. Se alimentó a los ratones KO y a los ratones normales con una dieta deficiente en colina, de aminoácidos definidos (dieta DCAA: Nakae D, y col., Cancer Res. 52:5042-5045, 1992) en lugar de una dieta general a partir del tiempo de 8 semanas de edad, y se sacrificaron 1, 3, o 6 meses después para observar la presencia del desarrollo de tumores hepatocelulares. También se determinó el contenido de lípidos (colesterol total, triglicéridos, y ácidos grasos libres) y la cantidad de peróxido lipídico en el hígado en los ratones a los que se les administró la dieta DCAA durante 6 meses (el número de individuos: n = 14). A este respecto, los lípidos del hígado se extrajeron con cloroformo/metanol, seguido por la determinación usando el analizador automatizado Modelo 7170 de Hitachi Ltd., y el peróxido lipídico se determinó usando un kit de medición de peróxido lipídico (de Waco).

30 2. Resultados del ensayo

La tasa de incidencia de tumores hepatocelulares en cada grupo de ratones se muestra en la Tabla 1, y el contenido de lípidos en el hígado de cada grupo de ratones en la Tabla 2.

[Tabla 1]

Incidencia del cáncer de hígado debido a la dieta CDAA			
	1 mes	3 meses	6 meses
ratones control, machos	0/6	0/6	0/14
ratones control, hembras	0/5	0/5	0/14
ratones KO, machos,	0/6	0/6	6/14
ratones KO, hembras	0/6	0/6	6/14

El valor dentro de cada celda muestra el número de ratones portadores de tumores/ número de ratones ensayados.

35

[Tabla 2]

Contenido en lípidos en el hígado después de la administración de la dieta CDA			
	colesterol total (mg/g (peso húmedo))	triglicéridos (mg/g (peso húmedo))	ácidos grasos libres (μ Eq/g (peso húmedo))
ratones control	2,1 \pm 0,436	112,825 \pm 44,4	5,133 \pm 1,258
ratones KO	2,367 \pm 0,115	131,900 \pm 115,918	4,025 \pm 1,053
Diferencia significativa (5 %)	N.S.	N.S.	N.S.
El valor dentro de cada columna muestra la media \pm la DT.			

5 Se sabe que la dieta DCAA altera la producción de VLDL a partir de lecitina en el hígado, causando un marcado hígado graso debido a la acumulación de triglicéridos en las células hepáticas, y dando como resultado la aparición de un tumor hepático aproximadamente un año más tarde. Por tanto, los ratones hembra también han mostrado tener una tasa de incidencia de cáncer más baja que los ratones macho. Sin embargo, en el grupo de los ratones KO a los que se les dio la dieta DCAA, incluso después de un periodo de administración de solamente 6 meses, el desarrollo de un tumor hepático (cáncer hepatocelular) se observó en 4 de 14 machos y en 2 de 16 hembras. Por lo tanto, se ha demostrado que una deficiencia de adiponectina en 13 sangres acorta el periodo antes de la aparición de un tumor y promueve la carcinogénesis en el hígado. A partir de este hecho, se puede deducir que la administración de adiponectina inhibe la carcinogénesis, particularmente en el hígado.

Ejemplo de Formulación 1: Inyección

adiponectina 2 mg
 tampón fosfato cantidad apropiada (pH 7,0)
 total: 1 ml

Esta se coloca en una ampolla de cristal de 2 ml, se sella y se esteriliza.

Ejemplo de Formulación 2: Comprimido (comprimido con recubrimiento entérico)

adiponectina 0,8 g
 almidón de maíz 12 g
 lactosa 27,2 g
 estearato de magnesio 0,4 g

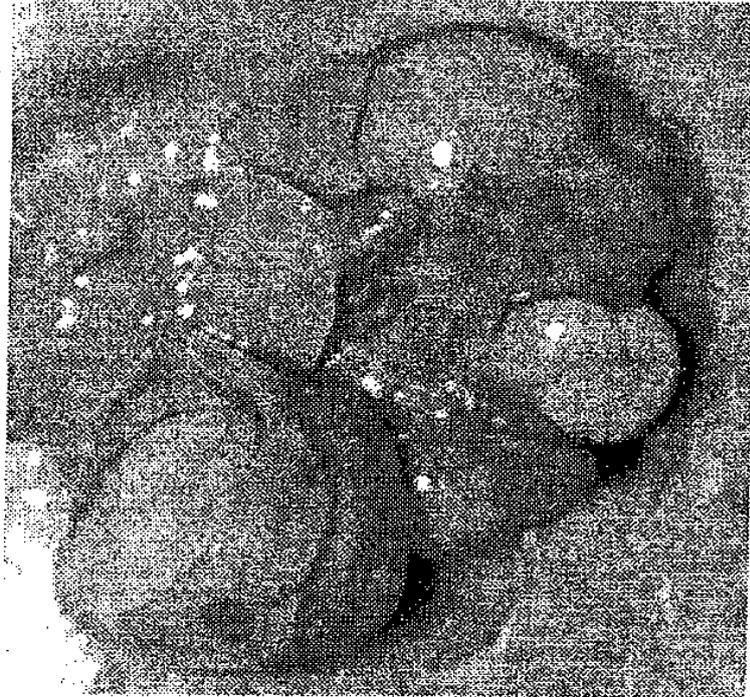
15 La adiponectina, lactosa, y almidón de maíz se mezclan minuciosamente para dar gránulos para la formación de comprimidos de acuerdo con un procedimiento de preparación de comprimidos húmedos. Se añade estereato de magnesio y la mezcla se comprime para dar 400 comprimidos. Se recubren los comprimidos con un agente de recubrimiento entérico (copolímero de ácido metacrílico).

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de adiponectina en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de un tumor hepático.
 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es en forma de una inyección.
 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la dosificación de dicha adiponectina es de 1 a 100 mg/kg/día por paciente adulto.
- 5

FIG 1



RATÓN KO



RATÓN de TS

FIG. 2

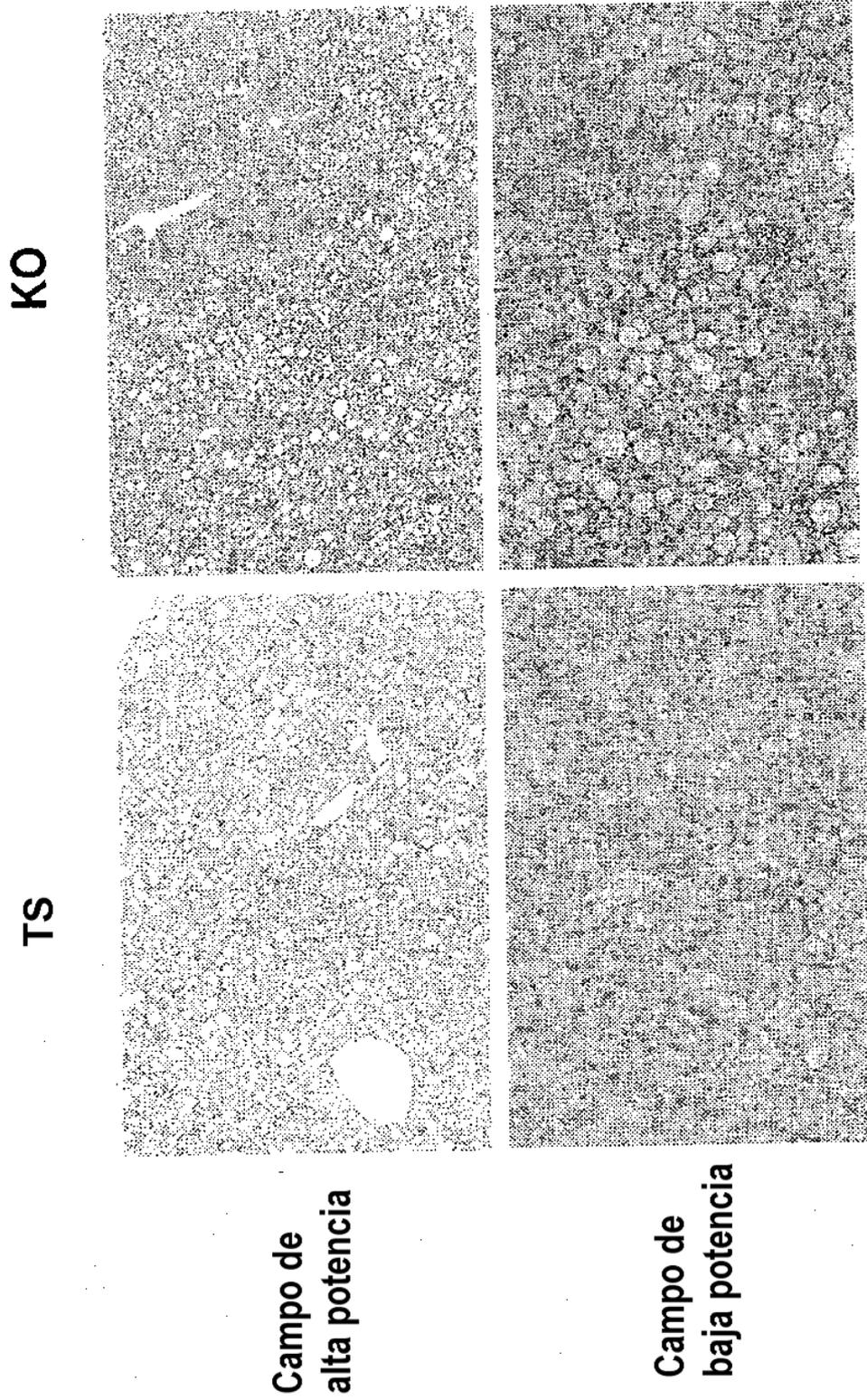


FIG. 3

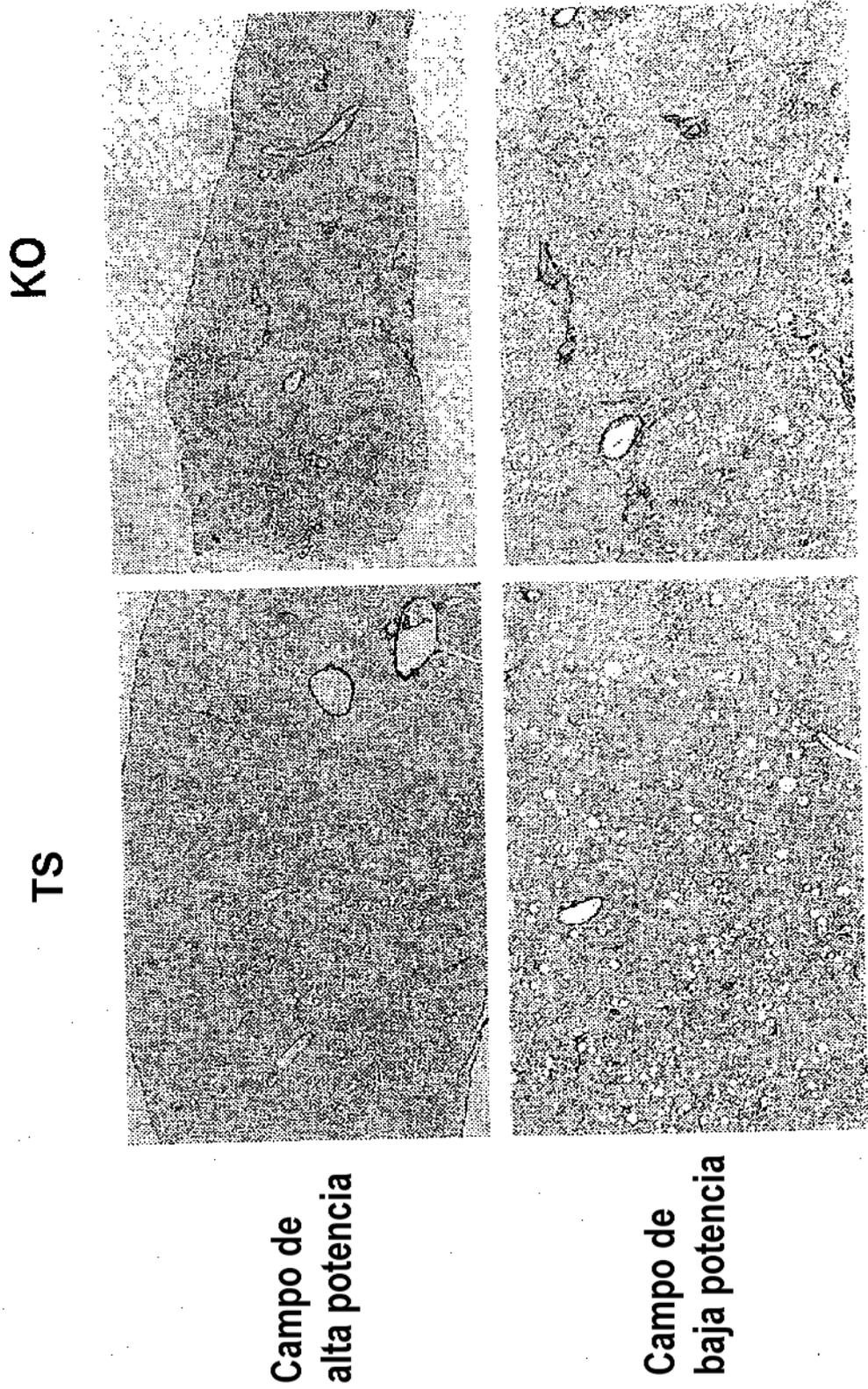


FIG. 4

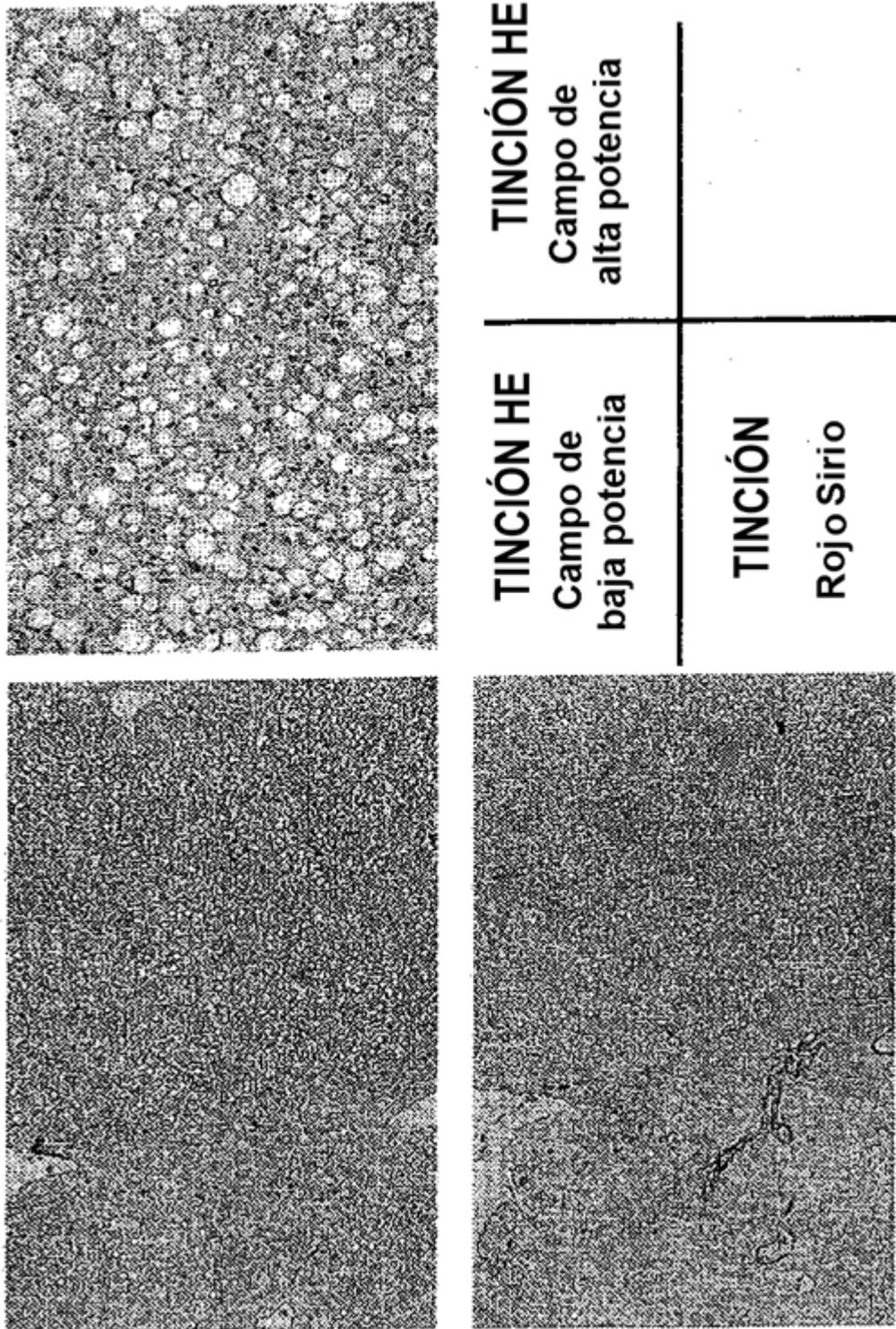


FIG. 5

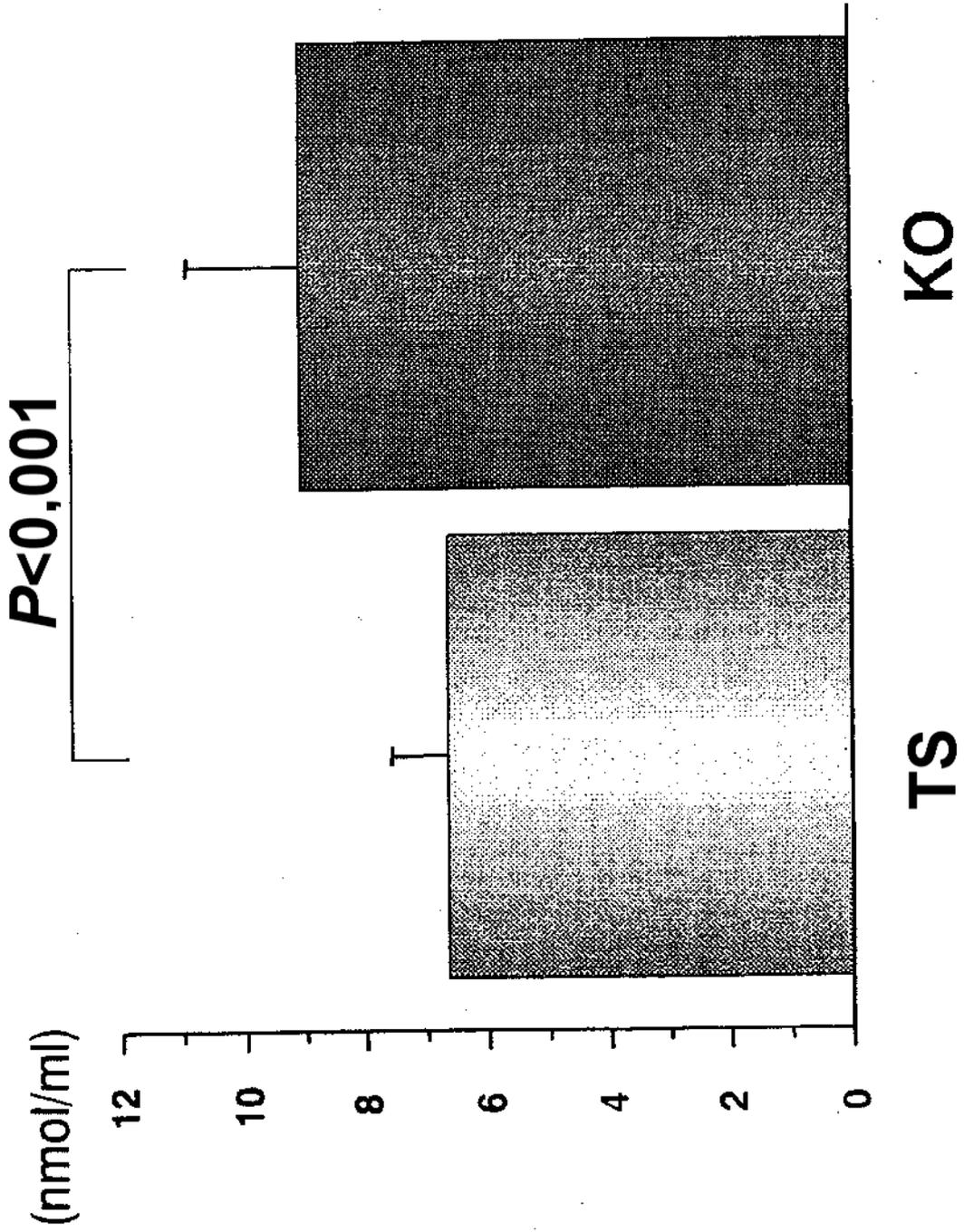


FIG. 6

