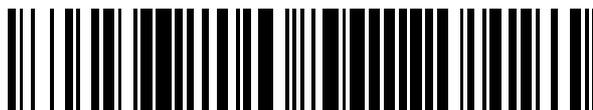


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 827**

51 Int. Cl.:

A61K 31/541 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/54 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2002 E 10009649 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2258373**

54 Título: **Composición que comprende taurolidina y/o taurultam para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

03.04.2001 US 280748 P

06.04.2001 US 281710 P

06.04.2001 US 281711 P

06.04.2001 US 281712 P

06.04.2001 US 281713 P

20.04.2001 US 284933 P

20.04.2001 US 284934 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2016

73 Titular/es:

**ED. GEISTLICH SÖHNE AG FÜR CHEMISCHE
INDUSTRIE (100.0%)**

**Bahnhofstrasse 40, P.O. Box 157
6110 Wolhusen, CH**

72 Inventor/es:

**REDMOND, PAUL H.;
STENDEL, RUEDIGER;
MOEHLER, HANNS y
PFIRRMANN, ROLF W.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 562 827 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

Composición que comprende taurolidina y/o taurultam para el tratamiento del cáncer

5 La invención se refiere al uso de los compuestos que contienen metilol taurolidina y taurultam para la fabricación de medicamentos para el tratamiento del cáncer.

10 Los agentes de transferencia de metilol, tales como el fármaco antibacteriano y anti-toxinas taurolidina y el producto relacionado taurultam, se ha demostrado que ejercen un efecto modificador sobre la toxicidad del factor de necrosis tumoral (TNF), el cual se utiliza, entre otras cosas, en el tratamiento de tumores. Además, la acción de agentes de transferencia de metilol ha demostrado ser selectiva en el sentido de que no se inhibió significativamente el crecimiento de líneas celulares normales.

15 La taurolidina actúa transfiriendo tres grupos metilol en el sitio de acción, siendo el taurultam un metabolito intermedio que a su vez transfiere un solo grupo metilol con la liberación del compuesto muy bien tolerado taurinamida. Así, los dos compuestos actúan esencialmente mediante el mismo mecanismo. Cabe señalar que la transferencia de metilol ha de contrastarse con la transferencia de metilo que es característica de muchos fármacos antitumorales altamente tóxicos. La taurolidina y el taurultam tienen baja toxicidad y no son citotóxicos contra las células normales.

20 El tratamiento de tumores con taurolidina y taurultam se divulga en los documentos WO 91/13628, WO 98/52572, WO 99/06114, EP 1 066 830 A2 y WO 01/39763.

25 La muerte celular programada es un principio biológico conservado a lo largo de la evolución destinado a la regulación del número de células. Las células sensibles contienen receptores de muerte que se activan cuando se secretan los ligandos apropiados de las células vecinas. Un sistema principal en la muerte celular programada es la apoptosis mediada por el ligando de Fas, también conocido como CD 95/APO-1, que es un receptor de superficie celular y un miembro de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral que media la apoptosis en las células sensibles a la oligomerización por el ligando de Fas (FasL).

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de tratamiento del cáncer, mediante el cual la muerte apoptótica de una célula neoplásica es inducida por contacto de dicha célula con una cantidad inductora de apoptosis de un compuesto que contiene metilol.

35 Una realización comprende el uso de un agente de transferencia de metilol en la fabricación de un medicamento para uso en la inducción de la muerte apoptótica de una célula neoplásica en un mamífero poniendo en contacto dicha célula con una cantidad inductora de apoptosis de dicho medicamento, en el que dicho medicamento es para ser administrado durante al menos dos ciclos de administración, incluyendo cada ciclo de administración (i) una fase de administración de 1 a 8 días durante la cual dicho medicamento se administra cada día a una dosis diaria total de 2 a 60 g de dicho agente de transferencia de metilol y (ii) una fase sin administración de 1 a 14 días, durante la cual no se administra agente de transferencia de metilol, en la que dicho medicamento se va a coadministrar con el ligando de Fas y en la que el agente de transferencia de metilol es taurolidina, taurultam o una mezcla de los mismos.

45 En otra realización, el cáncer de hígado es tratado por infusión intravenosa de soluciones que contienen un agente de transferencia de metilol, por administración directa a través de un catéter instalado en un vaso hepático, tal como la arteria hepática, la vena portal, o la arteria gastroduodenal.

50 En otra realización, se tratan tumores del sistema nervioso central, tales como el glioma/glioblastoma.

La presente invención se refiere a la capacidad de los agentes de transferencia de metilol, tales como taurolidina, para inducir toxicidad celular y aumentar la apoptosis mediada por el ligando de Fas en una terapia de combinación. Tanto la taurolidina como su congénere taurultam aumentan el efecto apoptótico del ligando de Fas en las células del cáncer en las concentraciones de fármaco que per se no muestran prácticamente ningún efecto sobre la viabilidad celular. En la línea celular de glioma maligno humano LN-229, la viabilidad celular se redujo inmediatamente después de la incubación con taurolidina o taurultam solo. Este efecto mejora la destrucción de las células LN-229 por el ligando de Fas. Por lo tanto, el uso de agentes de transferencia de metilol para inducir la muerte celular por apoptosis proporciona un medio para tratar el cáncer.

60 Las dos líneas celulares LN-18 y LN-229 representan sistemas modelo validados para la muerte celular apoptótica con diferentes sensibilidades frente al ligando de Fas. Por tanto, estas líneas celulares se utilizaron para comprobar el potencial de interacción de tales compuestos con la vía apoptótica. La viabilidad de las células de glioma maligno humano LN-18 y LN-229 se ve afectada por taurultam y taurolidina de forma diferente. Las células LN-18, que son altamente sensibles a la apoptosis inducida por el ligando de Fas, no se vieron afectadas por taurultam a todas las concentraciones ensayadas (5, 20, 100 µg/ml) (Ejemplo 6). La taurolidina fue capaz de reducir solo ligeramente la viabilidad de las células LN-18 a la mayor concentración ensayada (100 µg/ml). Por lo tanto, se alcanza el umbral

para la destrucción de las células LN-18 al 0,01 % de taurolidina. Por el contrario, las células LN-229 mostraron una sensibilidad mucho mayor a estos fármacos. En comparación con las células LN-18, tanto taurultam como taurolidina por sí mismos (100 µg/ml) redujeron fuertemente la viabilidad de las células LN-229. La taurolidina (100 µg/ml) causó una muerte dramática de las células LN-229 (70 %) y taurultam (100 µg/ml) fue capaz de reducir la viabilidad de las células LN-229 en un 30 %. En la concentración más alta ensayada (100 µg/ml), la taurolidina sola fue casi tan efectiva como el ligando de Fas en la inducción de la muerte celular. Por lo tanto, la taurolidina y el taurultam tienen la capacidad de destruir células malignas humanas.

El método se lleva a cabo mediante la administración a un mamífero que padece cáncer de las composiciones que contienen un compuesto que contiene metilol activo, en una dosis suficiente para inducir la muerte de las células neoplásicas por apoptosis. Por "compuesto que contiene metilol" o "agente de transferencia de metilol", se entiende un compuesto que contiene o es capaz de producir una molécula de metilol en condiciones fisiológicas, específicamente la taurolidina y el taurultam como se divulga en la patente US-5 210 083 y sus mezclas.

El tratamiento de un tumor autólogo, por ejemplo, un tumor del sistema nervioso central (SNC), se lleva a cabo mediante la administración a un mamífero, por ejemplo, un paciente humano, de un compuesto que contiene metilol. El compuesto se administra sistémicamente, por ejemplo, por vía oral o intravenosa, o es infundido directamente al sitio del tumor, por ejemplo, en el cerebro o en el líquido cefalorraquídeo. Una matriz sólida erosionable o reabsorbible tal como una oblea o esponja se puede implantar directamente en el tejido cerebral.

Los cánceres a los que la presente invención puede ser aplicable incluyen glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meningitis carcinomatosa, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer del sistema nervioso central (SNC), cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de células renales y metástasis de los mismos. Otros tipos de cáncer contra los cuales el método de la presente invención es eficaz incluyen otros carcinomas, sarcomas o linfomas, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de páncreas.

Las realizaciones particularmente preferidas implican el tratamiento de los cánceres seleccionados del grupo que consiste en glioma, neuroblastoma, astrocitoma, cáncer del sistema nervioso central (CNS), y cáncer de hígado, así como la inhibición de las metástasis tumorales de los mismos.

Es particularmente beneficioso utilizar taurolidina y/o taurultam, a concentraciones suficientes para inducir la apoptosis en células de cáncer, para prevenir la propagación de metástasis, especialmente después de la extirpación quirúrgica de los tumores. Los sujetos mamíferos son típicamente seres humanos.

Las cantidades para la administración eficaz de un agente de transferencia de metilol de acuerdo con la presente invención pueden comprender unidades de dosis farmacéutica dentro del intervalo de 0,1-1.000 mg/kg, preferiblemente de 150-450 mg/kg por día, y lo más preferiblemente 300-450 mg/kg por día. Alternativamente, las dosis pueden administrarse en una base de gramos/día, 2-60 g/día. Las dosis preferidas pueden estar en el intervalo de 2-30 o 2,5-30 g/día de taurolidina, 4-60 g/día de taurultam o una mezcla de los mismos. La mayoría de las dosis preferidas están en el intervalo de 10-20 g/día de taurolidina, 20-40 g/día de taurultam o una mezcla de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para inyección o infusión pueden comprender una solución isotónica que contiene uno o más agentes solubilizantes, por ejemplo, polioles tales como la glucosa, a fin de proporcionar soluciones de mayor concentración de taurolidina o taurultam. Tales soluciones se describen en el documento EP 253 662 B1. La concentración de taurolidina o taurultam en tales soluciones puede estar en el intervalo de 1-60 g/litro. Los agentes de transferencia de metilol son generalmente poco solubles en agua. Por lo tanto, se requiere a menudo administrar volúmenes relativamente grandes de soluciones acuosas que contienen taurolidina o taurultam, por ejemplo, de 10 g a 30 g de taurolidina y/o taurultam. Soluciones preferidas para la administración de acuerdo con la presente invención contienen aproximadamente 0,5-2 % de taurolidina y/o taurultam. Puede ser conveniente administrar estos compuestos por infusión dados los volúmenes relativamente grandes de que se trate, convenientemente a intervalos durante el día.

La administración, preferiblemente por infusión, de la dosis diaria total puede llevarse a cabo a una velocidad constante durante 24 horas, o de acuerdo a un programa de infusión más rápida de la dosis en porciones, con pausas entre cada porción de la dosis, por ejemplo, infusión de 250 ml de una solución al 2 % de taurolidina (dosis 5 g) durante 2 horas, seguido de una breve pausa de 4 horas, que se repite a lo largo de un período de infusión de 24 horas para lograr una dosis diaria total de 20 g. Alternativamente, se pueden infundir 250 ml de una solución de taurolidina al 2 % durante más de una hora, con una pausa de una hora entre las porciones de dosis, y se repiten hasta que se alcanza la dosis diaria, de tal modo que la dosis diaria total se proporciona en el transcurso de menos de 24 horas (es decir, aproximadamente la mitad del día), no administrándose infusión durante el resto del día.

De acuerdo con una realización, se administran por vía intravenosa cuatro botellas (250 ml cada una) de una solución de taurolidina al 2 % a pacientes con cáncer, a un ritmo de 40 gotas por minuto, una botella cada seis horas. El ciclo de terapia consiste en una fase administración de infusiones diarias durante una semana, seguido de una fase de reposo de dos semanas. El tratamiento total consiste en al menos dos de tales ciclos. La eficacia de la

solución al 2 % de taurolidina administrada por vía intravenosa se ha visto que es particularmente buena cuando se instilan 25-28 botellas de 250 ml de solución de taurolidina al 2 % por ciclo.

5 De acuerdo con una realización adicional de la invención, la fase de administración comprende un régimen diario mediante el que se administran 250 ml de solución de taurolidina al 2 % en el transcurso de 2 horas, seguido de un descanso de cuatro horas, repetido durante 24 horas para alcanzar la dosis diaria total.

10 De acuerdo con una realización adicional de la invención, la fase de administración comprende un régimen diario mediante el cual 250 ml de solución de taurolidina al 2 % se infunden durante una hora, seguido de una pausa de una hora, y se repite hasta que se alcanza la dosis diaria. Si la dosis total es de 20 g (por ejemplo), este régimen proporcionaría la dosis diaria con cuatro infusiones de 250 ml de taurolidina al 2 % en un lapso de tiempo de 7 horas. No se produce infusión durante el resto del día. Las tasas de infusión pueden prolongarse (por ejemplo, hasta 250 ml durante 90 o 120 minutos) si el paciente muestra parámetros hepáticos elevados.

15 En una realización adicional, se lleva a cabo la administración concomitante de anticonvulsivos y/o terapia anti-edema y/o antibióticos y/o reemplazo de fluidos y electrolitos.

1. Anticonvulsivos

20 Preferiblemente, el paciente debe ser estabilizado con medicamentos anti-convulsivos antes del tratamiento, para evitar complicaciones durante el tratamiento. Estos se pueden administrar convenientemente en parte en un contexto ambulatorio, así como para prevenir cualquier estabilización de emergencia con una medicación no deseada. El ácido valproínico es el agente de primera elección; la dosis debe ser determinada de acuerdo con las analíticas sanguíneas y administrarse en 2 dosis individuales. Normalmente, se requiere una dosis de 1.200 mg a 25 1.500 mg. Si no se suficiente un tratamiento con ácido valproínico, es posible un tratamiento de combinación con lamotrigina. En caso de alergias o si el ácido valproínico no se tolera, la estabilización primaria se va a hacer con lamotrigina. La fenitoína y la carbamazepina están contraindicadas.

30 2. Terapia anti-edema

Una terapia anti-edema también se puede administrar, pero solo si es absolutamente necesario, porque pueden producirse síntomas neurológicos focales o bien intensificarse o pueden desarrollarse síntomas de presión intracerebral. La dexametasona debería administrarse antes o después de la administración de taurolidina. La 35 terapia anti-edema se debe administrar con dexametasona, usando la menor dosis posible. Para proteger el estómago se puede administrar un tratamiento concomitante con ranitidina 1 x 150 mg/día. Si se observan problemas estomacales con esta terapia, se debe administrar un tratamiento alternativo con otros 1,2 x 20 mg/día.

40 En los casos de presión intracerebral masivamente elevada y eficacia insuficiente de dexametasona, es posible una terapia con manitol, en particular, a una dosis de hasta 4 x 250 ml/día.

40 3. La terapia con antibióticos

Se puede administrar un tratamiento antibiótico calculado con uno de los antibióticos enumerados a continuación hasta la llegada de la prueba de sensibilidad.

45 * Infección del tracto urinario:

primaria: cotrimoxazol
alternativa: doxiciclina

50 * Neumonía:

primaria: eritromicina
alternativa: doxiciclina

55 Los siguientes antibióticos solo deben utilizarse si es absolutamente necesario (en las infecciones más graves, potencialmente mortales) y si la situación de sensibilidad lo justifica: quinolona, penicilina, cefalosporina

60 4. Terapia con reemplazo de líquidos y electrolitos en relación con el tratamiento con taurolidina intravenosa al 2 %

Una cantidad de 250 ml de solución completa de electrolitos se administra preferiblemente al mismo tiempo y con la misma velocidad de infusión paralela a la infusión con 250 ml de taurolidina al 2 %. Los electrolitos y el hemograma deben ser controlados dos veces al día y la presión venosa central debe ser revisada una vez al día.

65 Si se observa una hipernatremia, primero, debe determinarse si la deshidratación es la causa. Los diuréticos solo deben usarse si el líquido se sustituye al mismo tiempo y después la deshidratación es descartada como la razón.

El compuesto que contiene metilol se administra solo o en combinación con uno o más agentes antineoplásicos adicionales. En una realización preferida, el agente suplementario destruye las células tumorales por un mecanismo distinto de la apoptosis. Por ejemplo, un antimetabolito, un análogo de purina o pirimidina, un agente alquilante, un agente de reticulación (por ejemplo, un compuesto de platino) y un agente de intercalación, y/o un antibiótico se administra en un régimen de terapia de combinación. El fármaco suplementario se administra antes, después o simultáneamente con el agente que contiene metilol. Por ejemplo, el agente de transferencia de metilol se puede coadministrar con una fluoro-pirimidina, tal como 5-fluoro-uracilo (5-FU). Las cantidades de administración diaria eficaces de una fluoro-pirimidina pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,1-1.000 mg por unidad de administración farmacéutica. Las cantidades de administración eficaces de 5-FU también pueden estar en el intervalo de aproximadamente 100-5.000 mg/m² de área superficial corporal, preferiblemente de aproximadamente 200-1.000 mg/m² de área superficial corporal, más preferiblemente de aproximadamente 500-600 mg/m² de área superficial corporal. El 5-FU típicamente se proporciona en ampollas de 250 mg o 500 mg para inyección, o cápsulas de 250 mg para la administración oral.

En otra realización, el efecto apoptótico de agentes de transferencia de metilol puede aumentarse mediante la co-administración con un ligando de Fas. Un polipéptido ligando de Fas se divulga en la patente US-5.858.990. Las cantidades terapéuticamente eficaces de ligando de Fas generalmente estarán dentro de un intervalo de aproximadamente 0,01-1.000 mg/kg de peso corporal del paciente, preferiblemente de aproximadamente 0,1-200 mg/kg de peso corporal del paciente, lo más preferible de aproximadamente 0,2-20 mg/kg de peso corporal del paciente. Las cantidades terapéuticamente eficaces se pueden administrar como dosis una vez al día, o varias veces al día como dos, tres, cuatro o más veces al día.

En las células LN-18 taurultam (100 g/ml) claramente mejoraba la apoptosis inducida por 0,4 o 2,0 % en volumen de ligando del Fas. Ejemplo 1. Esto es el más sorprendente ya que taurultam por sí solo no afectaba a la viabilidad celular a esta concentración. Por lo tanto, taurultam es capaz de intensificar la vía apoptótica inducida por el ligando de Fas. Lo mismo se puede aplicar a taurolidina (100 µg/ml), aunque taurolidina sola hizo reducir la viabilidad celular a esta concentración. Ejemplo 1. Estos resultados apoyan la idea de que el efecto apoptótico de taurultam y taurolidina se ve reforzado por el ligando de Fas. Cuando taurultam o taurolidina a una concentración de 100 µg/ml se combinan con el ligando de Fas, la pérdida total de células se representa como la suma de la atribuida al ligando de Fas y a la taurolidina o taurultam solos. Por lo tanto, la citotoxicidad de taurultam y taurolidina a esta concentración parece ser aditiva a la apoptosis mediada por Fas. A concentraciones más bajas, el efecto apoptótico de taurolidina y taurultam se ve en gran medida aumentado, más allá de un efecto aditivo, por la co-administración con el ligando de Fas.

La invención también incluye el tratamiento de un tumor resistente a fármacos, por ejemplo, un tumor resistente a múltiples fármacos (MDR), en un mamífero mediante la administración al mamífero de un compuesto que contiene metilol. El tumor a tratar es un carcinoma o sarcoma. El tumor resistente al fármaco se selecciona del grupo que consiste en un tumor sólido, un tumor no sólido y un linfoma. Por ejemplo, el tumor resistente a fármacos es un cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer del SNC, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga urinaria, linfoma, leucemia o sarcoma.

Según otra realización, una solución que contiene taurolidina y/o taurultam contiene además taurina, en una cantidad dentro de un intervalo de aproximadamente 1-20 g/l, preferiblemente de aproximadamente 5 g/l.

Una realización adicional proporciona métodos para el tratamiento tanto de tumores de hígado primarios como de sus metástasis, por administración directa de una solución que contiene un agente de transferencia de metilol en el hígado a través de un catéter instalado en un receptor hepático. Mediante la administración del agente de transferencia de metilol en una solución que ayuda al mantenimiento de la función hepática y condiciones no isquémicas, la terapia se dirige al órgano afectado, sin someter al órgano indebidamente a un estrés no necesario.

Para el tratamiento de tumores de hígado primarios, la solución de agente de transferencia de metilol se puede administrar a través de la arteria hepática, de manera que el agente terapéutico se administra en el órgano para un efecto máximo. Alternativamente, la solución puede ser suministrada a través de la arteria gastroduodenal, para su administración al hígado a través de la arteria hepática. La solución preferida para uso en esta realización es aquella que ayuda al mantenimiento de la función hepática y minimiza el estrés al órgano asociado con la infusión de grandes volúmenes de solución de agente de transferencia de metilol. Soluciones que se pueden usar en la presente invención se exponen en los Ejemplos.

Ejemplo 1: Solución isotónica de taurolidina al 2 %

Una composición adecuada para infusión intravenosa por goteo se muestra a continuación. Solución estéril isotónica, 100 ml:

2,0 g	Taurolidina
5,0 g	PVP 16 PF UP aqua dest. ad solut. 100 ml.
	PH 7,2 a 7,3

Filtrada en condiciones estériles y esterilización con vapor.

Ejemplo 2: Solución isotónica de Taurolin[®], taurolidina al 2 % con taurina y electrolitos

5 Otra composición adecuada para infusión intravenosa por goteo se muestra a continuación.

Solución estéril isotónica, 100 ml:

2,0 g	Taurolidina
5,0 g	PVP 17 PF UP
0,5 g	Taurina
0,3 g	Cloruro sódico

Filtrada en condiciones estériles y esterilización con vapor

10

Ejemplo 3: Solución Ringer isotónica de Taurolin[®] taurolidina al 2 % con taurina y electrolitos

Otra composición adecuada para infusión intravenosa por goteo se muestra a continuación.

15 Solución estéril isotónica, 100 ml:

2,0 g	Taurolidina
5,0 g	PVP 17 PF UP
0,5 g	Taurina
0,26 g	Cloruro sódico
0,0033 g	Cloruro potásico
0,004 g	Cloruro de calcio 2H ₂ O
0,003 g	Hidrógenocarbonato de sodio

Filtrada en condiciones estériles y esterilización con vapor

20 Ejemplo 4: Taurolin[®] Ringer Lactato Taurolidina al 2 % con taurina y electrolitos

Otra composición adecuada para infusión intravenosa por goteo se muestra a continuación.

Solución estéril isotónica, 100 ml:

25

2,0 g	Taurolidina
5,0 g	PVP 17 PF UP
0,5 g	Taurina
0,20 g	Cloruro sódico
0,013 g	Cloruro potásico
0,009 g	Cloruro de calcio 2H ₂ O
0,0033 g	Solución de lactato de sodio al 50 % (Farmacopea Europea)

Filtrada en condiciones estériles y esterilización con vapor

Ejemplo 5: Solución de taurultam

30

Una solución preferida comprende:

Ácido lactobiónico	35,830 g
Adenosina	1,340 g
Rafinosa pentahidratada	17,830 g
Hidroxietyl almidón (HES) PL 40/0,5	50,000 g
Glutación	0,929 g
Alopurinol	0,136 g
Taurultam	10,000 g
KCl	5,200 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,230 g
NaOH 25 % GV a pH 7,8	
Gránulos de NaOH Merck 6482	
Agua destilada	900 ml

35 La solución se esterilizó durante 16 minutos a 121 °C. El pH después de la esterilización fue de 7,2, y el pH de la solución lista para usar era 7,47.

Ejemplo 6: Inducción de la apoptosis

La taurolidina y el taurultam se ensayaron para determinar su capacidad para potenciar la apoptosis o inducir la muerte celular, solos y en combinación con el ligando de Fas, en líneas celulares de glioma maligno humano. Las dos líneas celulares LN-18 y LN-229 representan sistemas modelo validados para la muerte celular apoptótica con diferentes sensibilidades frente al ligando de Fas (Schlappbach y Fontana, 1997). Por tanto, estas líneas celulares se utilizaron para probar la interacción potencial de taurultam o taurolidina con la vía apoptótica.

1) Reactivos

Taurolidina (Nº de lote 41692/7) y taurultam (Lote E/39024/4) fueron proporcionados por Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza. El medio de cultivo DME y el suero fetal bovino (FBS) se adquirieron de Gibco BRL, Basilea, Suiza. El ensayo de proliferación celular WST-1 se adquirió de Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza. El ligando de Fas (sobrenadante de un sistema de sobreexpresión) y las líneas celulares de glioma humano LN-18 y LN-229 fueron amablemente proporcionadas por el Prof. A. Fontana, Instituto de Inmunología Clínica del Hospital Universitario de Zurich, Suiza.

2) Líneas celulares

Las líneas celulares LN-18 y LN-229 se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 % en DMEM que contiene 5 % de SFB y glutamina 2 mM (placas de 10 cm NUNCLON 15.035). En los experimentos en los que ligando de Fas se probó por sí solo, se sembraron aproximadamente 1x10⁴ células por pocillo en placas de 96 pocillos (NUNCLON 167.008) dando como resultado una confluencia de aproximadamente 60 % al día siguiente (17 h de incubación). En todos los demás experimentos se sembraron en placa aproximadamente 1,5x10⁴ células, lo que tuvo como resultado una confluencia de aproximadamente 90 % al día siguiente (17 h de incubación). Se añadió ligando de Fas como sobrenadante indicado como % en volumen (% en vol) del volumen total de cultivo.

3) Prueba de viabilidad celular

Las células LN-18 y LN-229 se incubaron en 50 µl de medio en la ausencia o presencia de cualquiera de ligando de Fas, taurultam, taurolidina o respectivas combinaciones de los mismos. Después de una incubación de 17 h la viabilidad celular se determinó mediante la adición de 50 µl de medio que contiene un reactivo WST-1 concentrado doble. La coloración resultante de la actividad de la succinato reductasa mitocondrial se midió en un lector de ELISA a 450 nm usando una longitud de onda de referencia de 690 nm.

Las líneas celulares de glioma maligno humano LN-18 y LN-229 se utilizaron para determinar la capacidad de taurolidina y taurultam para afectar a la viabilidad celular y/o para reforzar la apoptosis inducida por el ligando de Fas. Previamente se había descrito que las dos líneas celulares de glioma maligno humano, LN-18 y LN-229 mostraban diferente sensibilidad al efecto apoptótico del ligando de Fas (Schlappbach y Fontana, 1997).

1) Sensibilidad de LN-18 y LN-229 al ligando de Fas

En una primera serie de experimentos se investigó si la diferente sensibilidad de LN-18 y LN-229 al ligando de Fas se reproducía en nuestras condiciones experimentales. Las dos líneas celulares se incubaron durante la noche (17 h) en placas de 96 pocillos que contenían 1x10⁴ células por pocillo con concentraciones crecientes de ligando de Fas (3,1, 6,25, 12,5, 25,0 y 50 % en vol). En ausencia de ligando de Fas las células alcanzaron aproximadamente 60 % de confluencia después de la incubación durante la noche. En presencia de ligando de Fas LN-18 era extremadamente sensible, mostrando más del 90 % de la viabilidad celular en presencia de solo el 6,25 % en vol de ligando de Fas. Incluso al 3,1 %, se observó una reducción de aproximadamente 85 % en la viabilidad celular. Por el contrario, la viabilidad de las células LN-229 no se ve muy afectada por 6,25 % en vol de ligando de Fas (reducción de aproximadamente el 10 %) y se redujo solo a concentraciones más altas, con un máximo del 40 % de pérdida de células en presencia de la mayor concentración de ligando de Fas examinado (50 % en vol).

2) Influencia de taurultam sobre la apoptosis inducida por el ligando de Fas en células LN-18.

Las células LN-18 se incubaron durante 17 h con concentraciones crecientes de taurultam (5, 20, 100 µg/ml) en ausencia y presencia de dos concentraciones de ligando de Fas (0,4 % en vol y 2,0 % en vol). Taurultam por sí solo, incluso a la concentración más alta ensayada (100 µg/ml), no afectó a la viabilidad celular (se observó una reducción de aproximadamente 5 % con 5 y 20 µg/ml, y la viabilidad realmente pareció aumentar con 100 µg/ml). En presencia de 0,4 % en vol de ligando de Fas solo, la viabilidad celular se redujo aproximadamente solo un 10 %, un efecto que se mantuvo sin cambios en presencia de 5 o 20 µg/ml de taurultam. Sin embargo la viabilidad celular se redujo drásticamente cuando se incubaba simultáneamente 0,4 % en vol de ligando de Fas con 100 µg/ml de taurultam. Cuando se añadía el ligando de Fas a una concentración más alta (2,0 % en vol.), el ligando de Fas solo inducía apoptosis en el 60 % de las células. Este efecto también se incrementó con taurultam a 100 µg/ml, pero no con 5 o 20 µg/ml. Por lo tanto, taurultam es capaz de potenciar el efecto apoptótico del ligando de Fas en células LN-18 a una concentración (100 µg/ml), el cual por sí solo no afectaba a la viabilidad celular.

3) Influencia de la taurolidina sobre la apoptosis inducida por el ligando de Fas en células LN-18

Se incubaron células LN-18 durante 17 horas con 0,4 o 2,0 % en vol de ligando de Fas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de taurolidina (5, 20, 100 µg/ml). La taurolidina por sí misma no afectaba apreciablemente a la viabilidad celular produciendo una reducción de solo el 10 % en la concentración más alta ensayada (100 µg/ml). En la presencia de solo ligando de Fas (0,4 % o 2,0 %) la viabilidad celular se veía afectada de la misma manera que la descrita anteriormente. La viabilidad celular se redujo aún más por la taurolidina pero solo a la concentración más alta ensayada (100 µg/ml). Por lo tanto, la taurolidina fue capaz de mejorar el efecto del ligando de Fas en células LN-18 a una concentración (100 µg/ml), la cual no afectaba apreciablemente a la viabilidad celular per se.

4) Influencia de taurultam sobre la apoptosis inducida por el ligando de Fas en células LN-229

La incubación de las células LN-229 durante 17 h con taurultam solo no tuvo ningún efecto con 5 y 20 µg/ml, pero redujo la viabilidad celular en un 35 % a 100 µg/ml. Cuando las células LN-229 se incubaban solo con ligando de Fas (10 % o 50 %) la viabilidad celular se redujo aproximadamente en solo el 20 % en presencia de una alta concentración de ligando de Fas (50 % en vol). Cuando taurultam se añadió a concentraciones que eran inactivas per se (5 y 20 µg/ml) no se observó ningún cambio en la eficacia del ligando de Fas (10 o 50 % en vol). Sólo era con la mayor concentración de taurultam (100 µg/ml) cuando aumentaba más la pérdida celular inducida por el ligando de Fas. Por lo tanto, los resultados con LN-229 demuestran la capacidad de taurultam para mejorar la destrucción de las células en presencia de ligando de Fas.

5) Influencia de taurolidina sobre la apoptosis inducida por el ligando de Fas en células LN-229

La exposición de las células LN-229 a taurolidina solo durante 17 h causó una fuerte pérdida de la viabilidad celular de aproximadamente un 70 % a la concentración más alta ensayada (100 µg/ml). Por lo tanto, las células LN-229 eran más sensibles a la taurolidina que las células LN-18. Cuando se incubaba simultáneamente con ligando de Fas (10 % en vol), la destrucción celular se veía reforzada por la taurolidina a 100 µg/ml. Con 50 % en vol de ligando de Fas el efecto fue más pronunciado y evidente incluso para taurolidina 20 µg/ml.

Ejemplo 7: Uso y aplicación de taurolidina y/o taurultam para el tratamiento y/o profilaxis de tumores del sistema nervioso central

1. Células tumorales utilizadas para los experimentos

Para los experimentos, se utilizaron células tumorales gliales C6, células tumorales neuronales HT22, células tumorales de glioma/glioblastoma humano U373 y células derivadas de pacientes con glioblastoma.

2. Preparación de las células tumorales obtenidas del paciente

Las células tumorales obtenidas de pacientes con glioblastoma se obtuvieron intraoperatoriamente. El tejido tumoral se conservó en medio RPMI 1640 sin FCS. El tejido se subcultivó a continuación en matraces Falcon de 15 ml; se añadió tripsina 0,025 % con PBS, seguido de incubación a 37 °C. Después de esto, se añadió medio RPMI 1640 con FCS y se centrifugó. El siguiente paso fue la incubación con ADNasa, la resuspensión y la disociación, seguido por la etapa de lavado en medio para eliminar la ADNasa. Las células fueron cultivadas a continuación en matraces Falcon.

3. Método de acción anti-neoplásica de la taurolidina y/o sus metabolitos

Ultraestructuralmente se pudo observar la contracción del citoplasma, la condensación y la marginación de la cromatina. Estos cambios fueron evidentes ya a los 30 minutos de incubación con 0,1 µg/ml de taurolidina y aumentaron notablemente con el tiempo y con la concentración de taurolidina. Las mitocondrias no se vieron afectadas ultraestructuralmente. La citometría de flujo mostró un aumento inicial en el pico G0/G1 y en la fase S que se inicia a los 30 minutos. Estos cambios iniciales fueron seguidos por una disminución de la luz frontal y la dispersión lateral. Además, la fragmentación dependiente de la concentración de ADN comenzó a los 60 minutos. Después de 24 horas, la fragmentación del ADN era casi completa. A concentraciones de 2,0 µg/ml de taurolidina y más, los cambios en el tamaño celular eran solo mínimos.

Los resultados descritos en combinación con los resultados de los métodos de tinte especiales (preparación Leucostat) sugieren un mecanismo apoptótico de muerte de células tumorales. Las células cerebrales normales no se vieron afectadas por la incubación con taurolidina o taurultam en concentraciones de hasta 4 µg/ml durante un máximo de 5 días.

Ejemplo 8: Pauta posológica de dos ciclos para el tratamiento de pacientes con cáncer usando taurolidina intravenosa al 2 %.

Se administraron por vía intravenosa cuatro botellas (250 ml cada una) de una solución de taurolidina al 2 % a pacientes con cáncer, a un ritmo de 40 gotas por minuto, una botella cada seis horas. El ciclo de administración consiste en una fase administración de infusiones diarias durante una semana, seguido de una fase sin administración de dos semanas, y seguido de otra fase de administración de cuatro botellas por día como se indicó

anteriormente. Se ha observado que la eficacia de la solución de taurolidina al 2 % administrada por vía intravenosa es particularmente buena cuando se instilan por ciclo 25-28 botellas de 250 ml de solución de taurolidina al 2 %.

Ejemplo 9: Pauta posológica de cuatro ciclos para el tratamiento de pacientes con gliomas malignos usando taurolidina intravenosa al 2 %

El tratamiento comprende un mínimo de 4 ciclos. Cada ciclo tiene una duración de 7 días y está comprendido por lo siguiente:

1. Primer Ciclo

- a. Infusión intravenosa de 250 ml de taurolidina al 2 % y 250 ml de solución completa de electrolitos a través del catéter de la vena central con un tiempo de infusión de 60 minutos.
- b. Si esta terapia provoca elevación de los parámetros hepáticos, es necesario aumentar el tiempo de infusión a 90 o 120 minutos.
- c. Descanso de 60 minutos
- d. Repetir las terapias de los apartados a o b y c durante un total de 6 veces al día.
- e. Para un tiempo de infusión de 60 minutos la duración del programa de infusión diaria por 250 ml de taurolidina es de 11 horas, para 90 minutos de tiempo de infusión es de 14 horas y para 120 minutos de tiempo de infusión es de 17 horas. Durante el resto del tiempo no se administra ningún fármaco
- f. Fase de reposo

2. Ciclos posteriores

- a. Infusión intravenosa de 250 ml de taurolidina al 2 % y 250 ml de solución completa de electrolitos a través del catéter de la vena central con un tiempo de infusión de 60 minutos.
- b. Si esta terapia provoca elevación de los parámetros hepáticos, es necesario aumentar el tiempo de infusión a 90 o 120 minutos.
- c. Descanso de 60 minutos
- d. Repetir las terapias de los apartados a o b y c durante un total de 4 veces al día.
- e. Para un tiempo de infusión de 60 minutos la duración del programa de infusión diaria por 250 ml de taurolidina es de 7 horas, para 90 minutos de tiempo de infusión es de 9 horas y para 120 minutos de tiempo de infusión es de 11 horas. Durante el resto del tiempo no se administra ningún fármaco.

Ejemplo 10: Terapia del glioblastoma con taurolidina (observación de un caso)

El siguiente es un caso relacionado con el tratamiento de un solo individuo con un solo ciclo de tratamiento.

Paciente: "F.D.", varón, 59 años

Diagnóstico: glioma bifrontal maligno de gran tamaño (8 x 8 x 8 cm) con afectación del cuerpo caloso ("glioma en mariposa").

Procedimiento antes del tratamiento con taurolidina: El paciente fue remitido a los departamentos de neurocirugía en Heidelberg y Wurzburg, la operación fue denegada, la radioterapia y la quimioterapia fueron rechazadas por el paciente.

Tratamiento previo: corticosteroides orales.

Tratamiento planificado: taurolidina vía intravenosa

Principales molestias al ingreso: cefalea difusa, incontinencia urinaria, visión borrosa, afasia motora, trastornos de la marcha, problemas de memoria.

Exploración neurológica al ingreso: despierto con somnolencia, alerta, problemas de visión, afasia motora casi completa, apraxia, alteraciones de la marcha, incontinencia urinaria, deterioro mnésico grave y déficit de concentración

Índice de Karnofsky al ingreso: 20-30

RM en el día 1 del tratamiento (tratamiento previo): lesión que ocupa el espacio bifrontal (aproximadamente 8 x 8 x 8 cm) con forma irregular y potenciada con contraste de tipo anular y afectación destructiva del cuerpo caloso. El marcado efecto ocupante del espacio conduce a la desaparición de casi todos los espacios de reserva.

Tratamiento

Día 1: Consentimiento informado; Muestras de sangre; RM.

Día 2: Inserción de un catéter venoso central; Radiografía de tórax.

Días 3-8: Administración intravenosa de 4 x 250 ml de taurolidina al 2 %/día en 2 horas, seguido por un intervalo de 4 horas; muestras de sangre dos veces al día; sustitución de electrolitos.

Día 9: La administración intravenosa de 1 x 250 ml de taurolidina al 2 % en 2 horas; Alta.

Resumen del tratamiento:

En total, se administraron 25 x 250 ml de taurolidina al 2 % (125 g de taurolidina) sin efectos secundarios. Los electrolitos y los fluidos fueron sustituidos de acuerdo con los resultados de las muestras de sangre.

Principales molestias al alta: Dolor de cabeza mejorado, sin incontinencia urinaria, visión mejorada, marcha alterada mejorada, afasia motora ligeramente mejorada, deterioro de la memoria.

5 Exploración neurológica al alta: Despierto, alerta, visión mejorada, afasia motora ligeramente mejorada, marcha alterada mejorada, apraxia ligeramente mejorada, sin incontinencia urinaria, graves déficits mnésicos y déficits de concentración.

10 Índice de Karnofsky al alta: 40-50

En vista de la drástica mejora observada en el estado del paciente después de un solo ciclo de tratamiento, se espera que un régimen de infusión de al menos dos ciclos proporcionará el efecto terapéutico deseado.

15 Ejemplo 11: Tratamiento de un glioblastoma multiforme grave de grado IV

20 Antes del tratamiento el paciente presentaba glioblastoma multiforme grave de grado IV con lóbulo temporal izquierdo afectado. Antes del tratamiento, el tumor era prominente en las imágenes de tomografía computerizada del cráneo del paciente. Se obtuvieron imágenes del cráneo del paciente en una secuencia de imágenes ponderadas en T2 en los planos de orientación axial, sagital y coronal, así como en una secuencia de imágenes ponderadas en T1 los planos de orientación axial de forma nativa y axial, coronal y sagital después de la aplicación de medio de contraste, así como mediante espectroscopia de RM.

25 El paciente fue tratado con cuatro ciclos de tratamiento cada uno consistentes en una fase de infusión de siete días de una dosis diaria de 20 g de taurolidina (solución de taurolidina al 2 % 4 x 250 ml) y una fase de descanso de dos días. Después de los cuatro ciclos, el paciente se sometió a una fase adicional de infusión de dos días. Durante el tratamiento se obtuvieron imágenes de tomografía computerizada regulares del cráneo del paciente.

30 Al final del segundo ciclo de tratamiento (200 g de taurolidina administrados), el edema cerebral se había reducido notablemente. Al final del tercer ciclo de tratamiento (300 g de taurolidina administrados), el crecimiento del tumor se había detenido. Después de la finalización de todo el ciclo de tratamiento (600 g de taurolidina administrados), se observó por tomografía computerizada que el tumor se había desintegrado casi en su totalidad. Se observó poca o ninguna necrosis durante el ciclo del tratamiento, lo que indica que la reducción del tumor fue el resultado de la apoptosis.

35 Ejemplo 12: Tratamiento de tumores cerebrales con aplicación directa de taurolidina/taurultam

40 El agente de transferencia de metilol se aplica directamente a la cavidad del tumor utilizando tubos que contienen taurolidina/taurultam consistentes en varios segmentos con membrana semipermeable.

Después de la eliminación total o parcial del tumor, se implantó un tubo especial en la cavidad del tumor, de modo que el extremo de este tubo se encuentra subgaleal. El tubo incluye varios segmentos de material semipermeable, que contiene taurolidina/taurultam y se puede rellenar a través de un puerto subgaleal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un agente de transferencia de metilol en la fabricación de un medicamento para uso en la inducción de la muerte apoptótica de una célula neoplásica en un mamífero poniendo en contacto dicha célula con una cantidad inductora de apoptosis de dicho medicamento, en el que dicho medicamento es para ser administrado durante al menos dos ciclos de administración, incluyendo cada ciclo de administración (i) una fase de administración de 1 a 8 días durante la cual dicho medicamento se administra cada día a una dosis diaria total de 2 a 60 g de dicho agente de transferencia de metilol y (ii) una fase sin administración de 1 a 14 días, durante la cual no se administra agente de transferencia de metilol, en el que dicho medicamento se va a coadministrar con el ligando de Fas y en el que el agente de transferencia de metilol es taurolidina, taurultam o una mezcla de los mismos.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de transferencia de metilol es taurolidina y el medicamento se va a administrar durante cada fase de administración a una dosis diaria total de 2 a 30 g de taurolidina.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente de transferencia de metilol es taurultam y el medicamento se va a administrar durante cada fase de administración a una dosis diaria total de 4 a 60 g de taurultam.
- 20 4. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento se va a coadministrar con un otro agente antineoplásico.
- 25 5. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento comprende una solución del agente de transferencia de metilol, conteniendo dicha solución además taurina.
- 30 6. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento es para uso en el tratamiento o la profilaxis del cáncer de hígado.
- 35 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el medicamento se va a administrar a través de una vena portal en el tratamiento de cáncer de hígado metastásico.
- 40 8. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento se va a administrar durante cada fase de la administración por infusión continua de tal manera que la dosis diaria del agente de transferencia de metilol se infunde durante 24 horas.
- 45 9. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medicamento se va a administrar durante cada fase de la administración por infusión de tal manera que la dosis diaria del agente de transferencia de metilol se infunde como una serie de dosis parciales, estando cada infusión de dosis parcial seguida por un descanso durante el cual no se produce la infusión.
- 50 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las dosis parciales se van a infundir de tal forma que la dosis diaria total del agente de transferencia de metilol se administrará durante un ciclo de 24 horas.
- 55 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que cada dosis parcial se va a infundir durante el transcurso de dos horas, seguido de un descanso de cuatro horas.
- 60 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las dosis parciales se van a infundir de tal forma que la dosis diaria total del agente de transferencia de metilol se administrará durante un ciclo de menos de 24 horas.
- 65 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que cada dosis parcial se va a infundir durante el transcurso de una hora, seguido por un descanso de una hora.
14. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el medicamento se va a administrar en dos ciclos de administración.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que cada ciclo de administración comprende (i) una fase de administración de siete días durante la cual se administran cuatro porciones de 250 ml de solución de taurolidina al 2 % como una infusión continua durante cada uno de los siete días y (ii) una fase sin administración de siete días.
16. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el medicamento se va a administrar en cuatro ciclos de administración.
17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que cada ciclo de administración incluye una fase de administración de siete días durante cada día de los cuales se administran cuatro porciones de 250 ml de solución de taurolidina al 2 %, de tal manera que cada porción de dosis se infunde en el transcurso de una a dos horas, seguido de un descanso sin administración de una hora.

18. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho medicamento se va a coadministrar con 0,01-1000 mg/kg de peso corporal del paciente de dicho ligando de Fas.

5 19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho medicamento se va a coadministrar con 0,1-200 mg/kg de peso corporal del paciente de dicho ligando de Fas.

20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho medicamento se va a coadministrar con 0,2-20 mg/kg de peso corporal del paciente de dicho ligando de Fas.