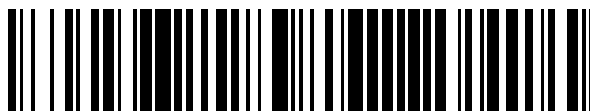


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 047**

51 Int. Cl.:

A61K 31/23 (2006.01)

A61K 31/231 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2014 PCT/KR2014/007620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15026112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2014 E 14838256 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3037092**

54 Título: **Composición que contiene compuesto de monoacetil diglicéridos como ingrediente activo para inhibir el cáncer de sangre**

30 Prioridad:

19.08.2013 KR 20130098185

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

13.08.2020

73 Titular/es:

**ENZYCHEM LIFESCIENCES CORPORATION
(50.0%)**

**Kaist-ICC F741 193 Munji-Ro Yusung-gu
Daejeon 305-732, KR y**

**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE
AND BIOTECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, JAE WHA;
OH, SEI RYANG;
AHN, KYUNG SEOP;
KANG, HO BUM;
SHIN, JAE MIN;
KO, YOUNG EUN;
LEE, TAE SUK;
KIM, MYUNG HWAN;
KANG, JONG KOO;
HAN, YONG-HAE y
SOHN, KI-YOUNG**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 779 047 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 contiene compuesto de monoacetil diglicéridos como ingrediente activo para inhibir el cáncer de sangre

5

[Campo técnico]

[0001] La presente invención se refiere a una composición para su uso en la inhibición del cáncer de sangre, que comprende un compuesto de monoacetil diglicéridos como ingrediente activo, y un uso del mismo.

10

[Técnica anterior]

[0002] Cáncer, que también se conoce como tumor, significa grupos de células anormales que se generan por una fragmentación y proliferación de células ilimitadamente continuadas, originadas por la destrucción del equilibrio entre la división celular y la apoptosis por una diversidad de causas. En general, los cánceres se expresan en diversas partes del cuerpo en más de 100 partes, incluidos órganos, glóbulos blancos, huesos, ganglios linfáticos, etc., y a continuación se convierten en síntomas graves a través de la infiltración en el tejido circundante y la transición a un órgano diferente. Las causas del cáncer incluyen factores ambientales o externos, como la radiación química, viral, bacteriana, ionizante, etc., y factores internos, como mutaciones genéticas congénitas, etc. El interés en la relación entre la inflamación crónica y el cáncer ha aparecido recientemente y se han presentado muchos datos que demuestran la relación entre la inflamación crónica y el cáncer. La infección y la inflamación crónica ocupan el 25 % de todas las causas de cáncer y se sabe que el riesgo de cáncer es mucho mayor en pacientes con inflamación crónica y enfermedades asociadas con ROS (especies reactivas de oxígeno). Se especula que una diversidad de mediadores que regulan la respuesta inflamatoria, es decir, la citocina, los radicales libres, el factor de crecimiento, etc. inducen cambios genéticos, epigenéticos, como mutaciones en genes supresores de tumores, metilación del ADN, modificación postranscripcional, etc., cambian la ruta esencial para mantener la homeostasis celular y además generan y desarrollan cáncer.

[0003] Si se encuentran cánceres en el inicio, se puede aplicar a los pacientes tratamientos médicos como radioterapia o quimioterapia, etc. Sin embargo, el efecto secundario del tratamiento médico se convierte en un gran problema. Si los cánceres se encuentran en estado terminal, los pacientes deben vivir en condiciones que limitan la vida sin un tratamiento especial. Por lo tanto, la investigación se ha llevado a cabo para desarrollar agentes anticancerígenos que tengan menos efectos secundarios y una gran eficacia a partir de productos naturales de baja toxicidad, como una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer. Se descubrió que el tratamiento que se origina en los productos naturales reduce el efecto secundario de la supresión de la hematopoyesis y la función inmune que a menudo se observa en la quimioterapia y la radioterapia.

[0004] EC-18, como una especie de compuestos monoacetil diglicéridos, se separó o extrajo de la cornamenta de ciervo natural. Se sabe que EC-18 aumenta la relación de supervivencia de los animales en el experimento de modelo animal con sepsis usando punción de ligadura cecal, y no muestra toxicidad en la prueba de toxicidad GLP (Good Laboratory Practice). Kim y col., 2009 (Journal of Korean Medical Science, vol. 24, páginas 474-480) indicaron que EC-18 inhibe la metástasis hematológica de la célula de cáncer biliar KIGB-5 en un modelo de hámster. Sin embargo, el efecto de los compuestos de monoacetil diacilglicerol que incluyen EC-18 no se conoce ni se describe en el cáncer de sangre o. Por lo tanto, los presentes inventores pretendieron encontrar un compuesto derivado de productos naturales o un novedoso compuesto para el inhibidor del cáncer de sangre y descubrieron que el compuesto de monoacetil diacilglicerol inhibe la secreción de IL-4 y la activación de STAT-6 para destruir el microambiente para el crecimiento del tejido canceroso y puede usarse para evitar o tratar el cáncer de sangre.

[Descripción]

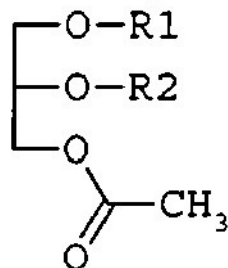
50

[Problema técnico]

[0005] Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que contiene un compuesto de monoacetil diacilglicerol representado por la siguiente fórmula 1 como ingrediente activo para su uso en la inhibición del cáncer de sangre, donde el cáncer de sangre es uno seleccionado de un grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, leucemia crónica y mieloma múltiple.

55

[Fórmula 1]



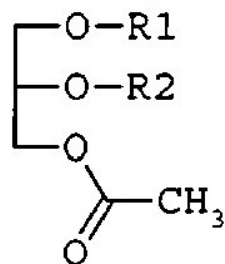
donde R1 y R2 son independientemente un residuo de ácido graso de 14 a 22 átomos de carbono.

5 **[0006]** Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para evitar o tratar el cáncer de sangre que comprende una etapa de administrar la composición anterior a un sujeto sospechoso de tener un ataque de cáncer de sangre o que padece cáncer de sangre donde el cáncer de sangre es uno seleccionado de un grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, leucemia crónica y mieloma múltiple.

10 [Solución técnica]

[0007] En un ejemplo para lograr estos y otros objetos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto de monoacetil diacilglicerol representado por la siguiente fórmula 1 como ingrediente activo para su uso en la inhibición del cáncer de sangre donde el cáncer de sangre es uno seleccionado de un grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, leucemia crónica y mieloma múltiple.

[Fórmula 1]



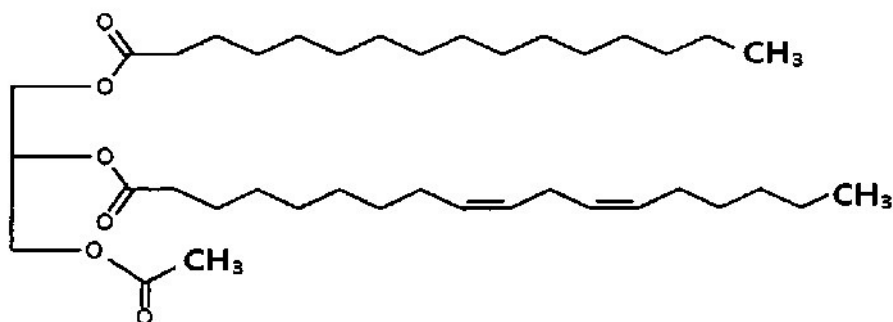
donde R1 y R2 son independientemente un grupo de ácido graso de 14 a 22 átomos de carbono. En la memoria
20 descriptiva, el grupo de ácido graso significa el grupo carboxilo de ácidos grasos del cual se extrae el grupo -OH.

[0008] En detalle, la composición farmacéutica para su uso en la inhibición del cáncer de sangre según la presente invención incluye un compuesto de monoacetil diacilglicerol representado por la fórmula 1. En la presente invención, el término "compuesto de monoacetil diacilglicerol" significa compuestos de glicerol que tienen un grupo
25 acetilo y dos grupos acilos, y puede denominarse "monoacetil diacil glicerol (MADG)".

[0009] En el compuesto de monoacetil diacilglicerol de fórmula 1, R1 y R2 son independientemente un residuo de ácido graso de 14 a 22 átomos de carbono. Preferentemente, los ejemplos no limitativos de R1 y R2 incluyen palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, linoleñoilo, estearoilo, miristoilo, araquidonoilo, etc. Las combinaciones preferibles de R1
30 y R2 (R1/R2) incluyen oleoilo/palmitoilo, palmitoilo/oleoilo, palmitoilo/linoleoilo, palmitoilo/linoleñoilo, palmitoilo/araquidonoilo, palmitoilo/estearoilo, palmitoilo/palmitoilo, oleoilo/estearoilo, linoleoilo/palmitoilo, linoleoilo/estearoilo, estearoilo/linoleoilo, estearoilo/oleoilo, miristoilo/linoleoilo, miristoilo/oleoilo, etc. En actividad óptica, el compuesto de monoacetil diacilglicerol de fórmula 1 puede ser forma (R), forma (S) o una mezcla racémica.

35 **[0010]** En una realización, el compuesto de monoacetil diacilglicerol es un compuesto de la siguiente fórmula 2.

[Fórmula 2]



[0011] El compuesto de fórmula 2 es 1-palmitoil-2-linoleoil-3-acetilglicerol, a veces denominado "EC-18" en esta memoria descriptiva. R1 y R2 del compuesto de fórmula 2 son palmitoil y linoleoil, respectivamente.

5

[0012] Los compuestos de monoacetil diacilglicerol pueden separarse y extraerse de la cornamenta de ciervo natural o pueden producirse mediante procedimientos de síntesis orgánicos conocidos (patentes coreanas registradas n.º 10-0789323). Más específicamente, la cornamenta de ciervo se extrae con hexano, seguido de la extracción del residuo con cloroformo y la eliminación del cloroformo para proporcionar extractos de cloroformo. El volumen de los disolventes para esta extracción es suficiente para sumergir la cornamenta de los ciervos. En general, se usan aproximadamente 4-5 litros de hexano y/o cloroformo por 1 kg de cornamenta de ciervo, pero no se limitan a los mismos. Los extractos obtenidos por este procedimiento se fraccionan y purifican adicionalmente usando una serie de cromatografía en columna de gel de sílice y un procedimiento de TLC para obtener el compuesto de monoacetil diacilglicerol para la presente invención. Se selecciona un disolvente para la extracción entre cloroformo/metanol, hexano/acetato de etilo/ácido acético, pero no se limita a los mismos.

[0013] Un procedimiento químico sintético para la preparación de compuestos de monoacetil diacilglicerol se muestra en las patentes coreanas registradas n.º 10-0789323. Específicamente, el procedimiento comprende (a) una etapa de preparación de 1-R1-3-grupo protector-glicerol mediante la adición de un grupo protector en la posición 3 de 1-R1-glicerol; (b) una etapa de preparación de 1-R1-2-R2-3-grupo protector-glicerol mediante la introducción de R2 en la posición 2 del grupo protector 1-R1-3-glicerol; y (c) una etapa de preparación del compuesto de monoacetil diacilglicerol deseado realizando una reacción de desprotección y la reacción de acetilación del 1-R1-3-grupo protector al mismo tiempo. El compuesto de monoacetil diacilglicerol puede purificarse adicionalmente si es necesario. Como alternativa, los compuestos de monoacetil diacilglicerol se pueden preparar por descomposición ácida de fosfatidilcolina (acetólisis) pero no se limita a la misma. Los estereoisómeros de los compuestos de fórmula (I) también están dentro del alcance de la invención.

[0014] En la presente invención, se muestra que los compuestos de monoacetil diacilglicerol son capaces de reducir la secreción de IL-4 y, por lo tanto, los compuestos de monoacetil diacilglicerol pueden usarse eficazmente para la supresión del cáncer de sangre donde el cáncer de sangre es uno seleccionado de un grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, leucemia crónica y mieloma múltiple.

[0015] En la presente invención, el término "cáncer" indica un estado en el que las células anormales que normalmente deberían ser destruidas pero vivas y excesivamente proliferadas por el trastorno de control de la célula misma, invaden los tejidos y órganos circundantes, para formar grumos y destruir o modificar el tejido existente y/o estructura orgánica, y el cáncer se usa indistintamente con la neoplasia maligna. El término "anticancerígeno" significa toda la actividad para inhibir la proliferación de células cancerosas o matar las células cancerosas. En la presente invención, el "cáncer de sangre" es uno seleccionado de un grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, leucemia crónica y mieloma múltiple. En la presente invención, el término "prevención" significa cualquier actividad para suprimir o retrasar el inicio del cáncer mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención y "tratamiento" significa cualquier acción para mejorar los síntomas causados por el cáncer o para cambiar los síntomas del cáncer a estados más beneficiosos.

[0016] El macrófago asociado al tumor (TAM), como macrófagos asociados con la progresión tumoral y la metástasis, se encuentra principalmente en la periferia del tumor. Un procedimiento para mejorar el microambiente tumoral para atacar el TAM mediante la inmunización de moléculas sobreexpresadas por el TAM se ha convertido en una nueva terapia contra el cáncer. Se sabe que el TAM, como un fenotipo de macrófagos M2, es inducido principalmente por citocinas Th2 como IL-4, IL-13, etc. En realidad, el TAM secreta el factor estimulante de la angiogénesis y la metaloproteinasas, y participa en las vías de señalización que controlan la acción de los fibroblastos del estroma tumoral para promover la proliferación y la metástasis de las células tumorales.

[0017] En la presente invención, el término "interleucina-4 (IL-4)" significa citocinas que tienen diversas funciones inmunomoduladoras secretadas por linfocitos Th2, eosinófilos, mastocitos, etc. Se ha indicado que la IL-4 se encuentra en una concentración más alta que el tejido normal, en muchas células cancerosas y se produce una gran cantidad de IL-4 en los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). Especialmente, la IL-4 es conocida por una citocina representativa que activa el TAM. En consecuencia, la IL-4 induce la activación del fenotipo de macrófago M2 M2 y, por lo tanto, induce el crecimiento tumoral, metástasis, angiogénesis, etc.

[0018] Además, se muestra que los compuestos de monoacetil diacilglicerol son capaces de inhibir la activación de STAT-6 y, por lo tanto, los compuestos de monoacetil diacilglicerol pueden usarse eficazmente para la supresión del cáncer de sangre. Se sabe que el término "STAT-6" de la presente invención, como factor de transcripción, desempeña un papel importante para realizar la respuesta biológica mediada por IL-4. Es decir, la activación de STAT6 en la forma fosforilada por IL-4 es seguida por la activación de la vía de señal de IL-4/STAT-6. Se sabe que la vía de señalización desempeña un papel importante en la resistencia a la proliferación/crecimiento celular y la apoptosis. En consecuencia, la supresión del STAT-6 provoca una inducción de apoptosis y una inhibición de la metástasis, y una destrucción del microambiente para el crecimiento del tejido canceroso, de modo que la composición de la presente invención se puede usar de recurso y combinación de recursos efectivos en el tumor.

[0019] En los ejemplos de la presente invención, se muestra que i) cuando la célula U937, la célula A549 y la célula Jurkat se tratan con IL-4 y EC-18, la fosforilación de STAT6 se inhibe dependiendo de la concentración de EC-18 (ejemplo experimental 1, figura 1 y figura 2), y ii) cuando STAT-6 se trata con EC-18 después de activar STAT-6 mediante el tratamiento de las células HEK293 y A549 con IL-4, la actividad de STAT-6 se reduce (ejemplo experimental 2, figura 3). En otro ejemplo de la presente invención, se demostró que la cantidad de secreción de IL-4 se reduce dependiendo de la concentración de EC-18, a partir de la observación de la cantidad de transferencia de IL-4 conforme a las concentraciones de EC-18 por análisis de absorción inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), en células RBL-2H3 (ejemplo experimental 3, figura 4 y figura 5), lo que sugiere que los compuestos de monoacetil diacilglicerol son efectivos en el tratamiento del cáncer de sangre. En detalle, la célula RPMI 8226 de la línea celular de cáncer de hueso que se origina en el cuerpo humano se trasplanta a ratones desnudos machos y se administra EC-18 de la sustancia de prueba por vía oral, posteriormente se evalúa el efecto de supresión del crecimiento tumoral. En un grupo de administración de sustancia de prueba de dosis de 500 mg/kg, el volumen del tumor se reduce estadísticamente significativamente, y también el peso del tumor se reduce estadísticamente significativamente, en comparación con el grupo de control negativo. En consecuencia, se muestra que EC-18 suprime el crecimiento tumoral (ejemplo experimental 4, figura 6 y figura 7), que demuestra que los compuestos de monoacetil diacilglicerol son efectivos para la prevención o el tratamiento del cáncer de sangre.

[0020] La composición farmacéutica que contiene compuestos de monoacetil diacilglicerol de la presente invención puede incluir adicionalmente vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales. La cantidad de compuestos de monoacetil diacilglicerol en la composición farmacéutica puede variar ampliamente sin limitación específica, y es específicamente del 0,0001 al 100,0 % en peso, preferentemente del 0,001 al 50 % en peso, más preferentemente del 0,01 al 20 % en peso con respecto a la cantidad total de la composición.

[0021] La composición farmacéutica puede formularse en diversas formas para la administración oral o no oral, por ejemplo, una seleccionada de un grupo que consiste en comprimido, bolo, polvo, gránulo, cápsula tal como cápsula de gelatina dura o blanda, emulsión, suspensión, jarabe, concentrado emulsionable, solución acuosa esterilizada, solución no acuosa, formulación liofilizada, supositorio, etc. Al formular la composición, se pueden usar excipientes o diluyentes convencionales tales como carga, agente de carga, aglutinante, agente humectante, agente desintegrante y tensioactivo. La formulación sólida para la administración oral incluye comprimidos, bolo, polvo, gránulos, cápsulas, etc., y la formulación sólida se puede preparar mezclando uno o más de los componentes activos y al menos un excipiente como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, gelatina, etc. Además del excipiente, también se puede usar un lubricante como el estearato de magnesio y el talco. La formulación líquida para la administración oral incluye emulsión, suspensión, jarabe, etc., y puede incluir diluyentes convencionales como agua y parafina líquida o puede incluir varios como agente humectante, agente edulcorante, agente aromatizante y agente conservante. La formulación para la administración no oral incluye solución acuosa esterilizada, solución no acuosa, formulación liofilizada, supositorio, etc., y el disolvente para dicha solución puede incluir propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal como el aceite de oliva y éster para la inyección de jeringas como el oleato de etilo. Los materiales de base del supositorio pueden incluir witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, laurina y glicerogelatina.

[0022] La composición de la presente invención puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente efectiva. La expresión "cantidad farmacéuticamente efectiva" se usa para referirse a una cantidad que es suficiente para lograr un resultado deseado en un tratamiento médico. La "cantidad farmacéuticamente efectiva" se puede determinar conforme al tipo, edad y sexo de un sujeto, gravedad y tipo de enfermedad, actividad del fármaco, sensibilidad al fármaco, tiempo de administración, período y vía, tasa de excreción y otros criterios bien conocidos en el campo de la medicina. La composición de la presente invención puede administrarse sola o con otros medicamentos de forma secuencial o simultánea, o administrarse una o varias veces. Teniendo en cuenta todos los factores anteriores, es importante dosificar la cantidad que puede lograr el efecto máximo con la cantidad mínima sin efectos secundarios, que pueden determinar fácilmente los expertos en la materia. La cantidad preferible de la composición

de la presente invención se puede variar conforme a la condición y el peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tipo de formulación del fármaco, la vía de administración y el período del fármaco. La cantidad total apropiada de administración por 1 día puede ser determinada por un médico con antecedentes médicos relacionados, y generalmente de 0,001 a 1000 mg/kg, preferentemente de 0,05 a 200 mg/kg, más preferentemente de 0,1 a 100 mg/kg una o varias veces dividiendo en 1 día. La composición de la presente invención se puede administrar a cualquier sujeto que requiera la supresión del cáncer de sangre. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede administrarse no solo a seres humanos sino también a animales no humanos (específicamente mamíferos) como monos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones, vacas, ovejas, cerdos, cabras, etc. La composición de la presente invención puede administrarse por diversos procedimientos convencionales, por ejemplo, por administración oral o recto, o por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o cerebrovascular.

[0023] Como otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento para evitar o tratar el cáncer de sangre que comprende una etapa de administrar la composición farmacéutica a un sujeto que sospecha que tiene cáncer de sangre. El "sujeto que sospecha que tiene cáncer de sangre" incluye no solo un animal, incluido un ser humano que tiene cáncer de sangre, sino que también puede tener cáncer de sangre. El sujeto que sospecha que tiene cáncer de sangre puede tratarse eficazmente administrando la composición farmacéutica de la presente invención. El término "administrar" significa introducir la composición farmacéutica de la presente invención en el sujeto que sospecha que tiene cáncer de sangre por cualquier medio. La vía de administración puede ser cualquier vía como oral o no oral.

[0024] El procedimiento para tratar el cáncer de sangre comprende una etapa de administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende los compuestos de monoacetil diacilglicerol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos a un paciente que lo necesite. Un médico puede determinar una cantidad total apropiada de administración por 1 día, y generalmente es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,05 a 200 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg. La cantidad de administración total por día se puede administrar una vez al día o se puede administrar en dosis divididas varias veces al día. Sin embargo, la cantidad terapéuticamente efectiva específica del monoacetil diacilglicerol administrado a un paciente en particular se puede variar según el tipo y el grado de respuesta que se logrará en el tratamiento, la composición específica, incluido si se incluye otro agente en la composición, la edad del paciente, el peso corporal, el estado general de salud, sexo, dieta, hora de administración, vía de administración, la relación de composición, período de tratamiento, otros fármacos utilizados juntos en el tratamiento y una diversidad de factores bien conocidos en el campo de la medicina.

[Efecto de la invención]

[0025] Los compuestos de monoacetil diacilglicerol de la invención son excelentes en el efecto de inhibir la expresión de IL-4 e inhibir la actividad de STAT-6, superando así los efectos secundarios del inhibidor utilizado actualmente para el cáncer de sangre, sin tener toxicidad y excelente efecto de tratamiento de modo que los compuestos de monoacetil diacilglicerol pueden usarse de manera útil para la prevención, el tratamiento y la mejora del cáncer de sangre.

[Breve descripción de los dibujos]

[0026]

La figura 1 presenta análisis Western blot en células U937, que muestra el efecto inhibitorio de la fosforilación de (A) STAT-6, que está fosforilada por IL-4, dependiendo de la concentración de EC-18 y (B) STAT-6, que está fosforilada por IFN- γ , dependiendo de la concentración de EC-18.

La figura 2 presenta análisis de Western blot en la célula A549 (A), la célula U937 (B) y la célula Jurkat (C), que muestra el efecto inhibitorio de la fosforilación de STAT-6 que está fosforilada por IL-4, dependiendo de la concentración de EC-18.

La figura 3 presenta los valores de la luciferasa emisora de luz de STAT-6 que es activada por IL y STAT-1 que es activada por IFN- γ , dependiendo de la concentración de EC-18, en la célula HEK293 y la célula A54.

La figura 4 presenta la cantidad de transferencia de IL-4 dependiendo de la concentración de EC-18, en la célula RBL-2H3, que se midió mediante un análisis de absorción inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La figura 5 muestra el nivel de expresión de IL-4 a lo largo del tiempo (6 h, 15 h y 24 h) dependiendo de la concentración de EC-18, en la célula RBL-2H3.

La figura 6 es un gráfico que muestra la reducción del volumen del tumor mediante el tratamiento con EC-18 en el animal modelo con el que se trasplantan las células de cáncer de sangre humano.

La figura 7 es un gráfico que muestra la reducción del peso del tumor mediante el tratamiento con EC-18 en el animal modelo con el que se trasplantan las células de cáncer de sangre humano.

La figura 8 presenta fotografías que muestran el cambio de tamaño del tumor, en el grupo tratado con EC-18, control negativo y control positivo del modelo de ratón con cáncer de sangre.

[Descripción detallada de la invención]

[0027] Se hará una descripción más detallada de la invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos, que están destinados a una mejor comprensión de la presente invención y no limitarán la presente invención.

Ejemplo: Cultivo celular

5

[0028] La línea celular humana U937, A549, Jurkat, HEK293 y la línea celular de ratas RBL-2H3 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD) se cultivaron a 37 °C bajo condición húmeda del 5 % de CO₂. Las líneas celulares U937, Jurkat, K562 y A549 se cultivaron en medio RPMI1640 (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) que contenía suero elegante al 10 % (suero de ternero fetal, FCS, HyClone, Logan, UT), L-glutamina 2 mM, 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Life Technologies), la línea celular HEK293 se cultivó en medio DMEM, y la línea celular RBL-2H3 se cultivó en medio MEM.

Ejemplo experimental 1: efecto inhibitor de EC-18 sobre la fosforilación de STAT-6

15 **[0029]** Las células tratadas con EC-18 e IL-4 e IFN-γ se lisaron con tampón de lisis SDS-frío [(HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM, NPS 40 al 0,5 %, SDS al 0,1 %, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 10mM, y cóctel completo de inhibidor de proteínas (Roche)] durante 30 minutos en hielo. Después de la célula Posteriormente, se aisló el ARN después de disolver las células., la solución acuosa se separó del precipitado insoluble centrifugando los lisados celulares durante 30 minutos a 13.000 rpm en una centrifuga de alta velocidad. Después de cuantificar la solución acuosa de células
20 separadas, la solución cuantificada se separó en SDS-PAGE al 10 a 12 % por electroforesis. Las proteínas celulares separadas en el gel se transfirieron a la membrana PVDF (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) durante dos horas a 100V.

[0030] Para medir la cantidad de STAT1, STAT6 fosforilado en las células, la membrana se incubó con anti poli conejo (STAT1, STAT6),- fósforo (STAT1, STAT6) (Cell signaling Technology, EE. UU.) (1:1000) como anticuerpo
25 primario a temperatura ambiente durante 60 minutos. La membrana se incubó con anti IgG conejo de cabra conjugada con peroxidasa de peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) (1: 3000) como anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 60 minutos. La misma cantidad de proteínas celulares fue confirmada por el anticuerpo anti poli conejo (STAT1, STAT6). Después de la incubación con anticuerpos, la membrana se incubó con solución de ECL (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) y se expuso a una película de rayos X. La cantidad de STAT
30 fosforilada se midió en la banda de la película.

[0031] El resultado muestra que STAT-6 se fosforila en células A549 de células epiteliales y células U937 y Jurkat de células inmunes, y la cantidad de STAT-6 fosforilada disminuye por el pretratamiento de EC-18 de una manera dependiente de la concentración (figura 1-A, figuras 2-A a C). La figura 1B muestra que no hay disminución
35 de la fosforilación en STAT-1 por EC-18.

Ejemplo experimental 2: medición del efecto inhibitor de EC-18 sobre la activación de STAT-6 usando el indicador de luciferasa

40 **[0032]** El vector p4xSTAT6-Luc2P (Addgene) que contiene el elemento STAT-6 (SIE) al que se une STAT-6 se introdujo en células HEK293 y células A549. La inhibición de la activación de STAT-6 por EC-18 se midió tratando previamente las células con EC-18 y a continuación tratando las células con IL-4. Además, la activación de STAT-1 se midió usando el vector pGL4.45 [luc2P/ISRE/Hygro] (Promega) que contiene el elemento de respuesta estimulada por interferón (ISRE) al que se une STAT-1.

45

[0033] Después de interrumpir las células mediante tratamiento con tripsina-EDTA, las células HEK293 y las células A549 se dividieron en la placa de cultivo. Usando reactivo de transfección Attractene (Qiagen), las células fueron transfectadas con p4xSTAT6-Luc2P y pGL4.45 [luc2P/ISRE/Hygro] y se incubaron a 37 °C bajo condiciones de 5 % de CO₂ durante un día. Al día siguiente, se recogieron las células de la placa de cultivo y se transfirieron 0,1 ml de células a la placa de 96 pocillos en una concentración de 5 x 10⁴ células/pocillo y se incubaron a 37 °C bajo condiciones de 5 % de CO₂ durante un día. Al día siguiente, las células se trataron previamente con diferentes concentraciones de EC-18 durante una hora y a continuación se trataron con 10 ng/ml de IL-4 e IFN-γ. Después de la incubación a 37 °C bajo condiciones de 5 % de CO₂ durante 6 horas, se midió la actividad de lucifereasa usando el sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega). Específicamente, se añadieron a cada pocillo 0,1 ml de una
50 mezcla 1:1 del sistema y sustrato de ensayo de luciferasa ONE-Glo. Después de tres minutos, la fluorescencia por IL-4 e IFN-γ se midió con el sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo (Promega) de la siguiente manera. Específicamente, se añadieron 0,1 ml de una mezcla 1:1 de tampón y sustrato de ensayo de luciferasa ONEONE-Glo™ a cada uno de los 96 pocillos. Después de tres minutos, se midió la fluorescencia usando VICTOR X Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) durante 0,5 segundos.

60

[0034] La fluorescencia de luciferasa disminuyó en las células pretratadas con diferentes concentraciones de EC-18, en comparación con las células tratadas solo con IL-4, lo que indica una disminución de la actividad de STAT-6 en las células pretratadas con EC-18. Por otro lado, la fluorescencia de luciferasa de STAT-1 por EC-18 se mantuvo en células tratadas con IFN-γ (figura 3). El resultado muestra que la activación de STAT-6 inducida por IL-4 disminuye
65 con el tratamiento de EC-18 en células HEK293 y células A549.

Ejemplo experimental 3: efecto inhibitor de la expresión del gen IL-4 del EC-18**Ejemplo experimental 3-1: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)**

- 5 **[0035]** Después del pretratamiento de las células RBL-2H3 con EC-18, se indujo actividad celular por antígeno para IgE, y como resultado, se realizó el cambio en los niveles de ARNm de las citocinas IL-4 expresadas en RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. El ARN total se aisló según los protocolos estándar, el ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de ADNc AccuScript High Fidelity 1st Strand (Stratagene) según las
- 10 instrucciones del fabricante. Etapa 2 Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando el cebador oligo-dT y transcriptasa inversa, un par de cebadores específico y polimerasa Taq (Takara, Shiga, Japón). Se usó una síntesis de ADNc de 1 µl en una reacción de PCR de 20 µl que constituye 0,5 U Taq ADN polimerasa, 1 tampón y una mezcla de dNTP 1 mM (Takara) y pares de cebadores específicos.
- 15 **[0036]** La amplificación por PCR se realizó utilizando un sistema GeneAmp PCR 2700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, EE. UU.) en las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°, a continuación 45 segundos a 94°, 45 segundos a 56° y 1 minuto a 72°, y a continuación se sometió a 25 a 40 ciclos). La reacción de extensión final se llevó a cabo a 72° durante 7 minutos. La tabla 1 muestra las secuencias de cebadores usadas en la amplificación de ADNc por PCR. Los cebadores de PCR se diseñaron usando el programa Primer3 y se compraron de Bioneer, Inc. (República
- 20 de Corea, Daejeon).

[Tabla 1]

Nombre	Cebador directo	Cebador inverso
GAPDH	CCATCACCATCTTCCAGGAG (SEQ ID NO: 1)	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT (SEQ ID NO: 2)
IL-4	AATGGGTCTCACCTCCCAAC (SEQ ID NO: 3)	TTCAGCTCGAACACTTTGAA (SEQ ID NO: 4)

- 25 **[0037]** El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1,5 %, se tiñó con bromuro de etidio a (bromuro de etidio, EtBr), se visualizó mediante transiluminador UV Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) y a continuación se analizó utilizando software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Cada muestra se analizó al menos tres veces y se propuso un representante de los datos. Las células se trataron previamente con 0,01, 0,1, 1,0, y 10 µg/ml de EC-18, respectivamente, durante 1 hora y se procesó antígeno, y se incubó durante 3 horas.
- 30 Posteriormente, el ARN se aisló después de la lisis celular. El ADNc se preparó usando transcriptasa inversa (transcriptasa inversa) con poli A + cebadores en ARN. Los cebadores de diseño para IL-4 se usaron en la amplificación por PCR (tabla 1). GAPDH se utilizó como patrón interno.

Ejemplo experimental 3-2: confirmación de la inhibición de la secreción de IL-4 por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

- 35 **[0038]** Las células se trataron con 0,1 pg/ml a 10 µg/ml EC-18 durante 1 hora y se procesó antígeno. Después de la incubación durante 18 horas a 37 °C, la célula se retiró para obtener un sobrenadante. La cuantificación de IL-4 de rata que estaba presente en el medio de cultivo celular de células RBL-2H3 se realizó llevando a cabo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) según el protocolo indicado por el fabricante utilizando anticuerpos monoclonales (mAb) adquiribles en el mercado (BD Biosciences).

- 40 **[0039]** Como resultado, se confirmó que en las células RBL-2H3 tratadas con el EC-18, la expresión del transcrito de IL-4 se redujo en proporción a la concentración del EC-18 (figura 4) y la expresión de la secreción de IL-4 inducida por el antígeno se redujo conforme al tratamiento EC-18 en las células RBL-2H3 (figura 5). Además, se confirmó que la secreción de IL-4 expresada en cada momento se redujo de una manera dependiente de la concentración de EC-18, y en 10 µg/ml de concentración de EC-18, la secreción de IL-4 fue inhibida por hasta 60 % o más.

Ejemplo experimental 4: análisis de eficacia antitumoral por EC-18 en modelos de animales con cáncer

- 45 **[0040]** La inhibición del crecimiento tumoral se evaluó después de que se administró por vía oral el EC-18 de la sustancia de prueba a ratones desnudos machos a los que se trasplantaron células RPMI 8226, derivadas de una línea celular de cáncer de médula ósea humana. El experimento incluyó seis grupos: el grupo de control negativo;
- 50 dosis de 500 mg/kg del grupo de administración de la sustancia de prueba; el grupo de combinación al que se administran 500 mg/kg de la sustancia de prueba y 80 mg/kg de dosis de sustancia de control positivo (gemcitabina, Gemcitabina); el grupo de combinación al que se administran 500 mg/kg de sustancia de prueba y 120 mg/kg de dosis de sustancia de control positivo; dosis de 80 mg/kg del grupo de control positivo y dosis de 120 mg/kg del grupo de control positivo. Cada grupo consiste en 10 ratones. Se administró un excipiente de aceite de oliva al grupo de control
- 60 negativo. En el grupo de administración de sustancias de prueba, la administración de EC-18 a sus estómagos se

realizó una vez al día durante 4 semanas (un total de 28 administraciones). En el grupo de control positivo, la administración de la sustancia de control positivo de Gemcitabina a la cavidad abdominal se realizó dos veces por semana durante 4 semanas (un total de 8 administraciones). Durante el período de observación, se observaron síntomas comunes una vez al día, se midió el peso del animal y el volumen tumoral (mm³) en animales dos veces por semana. Después del final del período de observación, se extirpó el tumor y se midió su peso (peso tumoral, g), los resultados se muestran en las figuras 6 y 7. Como se muestra en las figuras 6 y 7, en el grupo de administración de la sustancia de prueba de dosis de 500 mg/kg, el volumen de los tumores se suprimió significativamente en comparación con el grupo de control negativo estadísticamente, y el peso del tumor también fue estadísticamente significativo pequeño en comparación con el grupo de control negativo de modo que el crecimiento del tumor fue inhibido. Además, en los ratones modelo de cáncer de sangre, la fotografía que muestra el cambio en el tamaño del tumor después de la administración del EC-18 y el control positivo gemcitabina se mostró en la figura.8. Como se muestra en la figura 8, se confirmó que incluso cuando se administró el EC-18, el tamaño del tumor se redujo de forma similar al control positivo.

15 **[0041]** A partir de la descripción anterior, un experto en la materia apreciará que la invención puede realizarse de otras formas específicas sin cambiar el espíritu técnico o las características esenciales. A este respecto, los ejemplos descritos anteriormente pretenden ser ilustrativos en todos los aspectos y deben entenderse como no limitativos. Debe entenderse que el alcance de la invención incluye todos los intervalos de la descripción detallada anterior y las reivindicaciones adjuntas, en lugar de los intervalos de los ejemplos específicos, así como todas las modificaciones derivadas de esos equivalentes.

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Enzychem Lifescience Corporation

25 <120> Composición para tratar el cáncer de sangre e inhibir la metástasis que comprende compuesto de monoacetil diacilglicerol

<130> PD10525/PCT10394

30 <150> KR 10-2013-0098185
<151> 2013-08-19

<160> 4

35 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador directo GAPDH

45 <400> 1
ccatcacat ctccaggag 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso GAPDH

55 <400> 2
acagtctct gggggcagt 20

60 <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo IL-4

65

ES 2 779 047 T3

<400> 3
aatgggtctc acctccaac 20

5 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

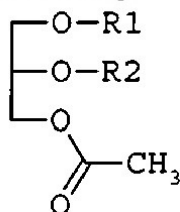
10 <220>
<223> Cebador inverso IL-4

<400> 4
ttcagctcga acacttgaa 20

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto de monoacetil diacilglicerol de fórmula 1 como ingrediente activo para su uso en la inhibición del cáncer de sangre, donde el cáncer de sangre es uno seleccionado del grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda, leucemia crónica y mieloma múltiple.

[Fórmula 1]



donde R1 y R2 son independientemente un grupo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono.

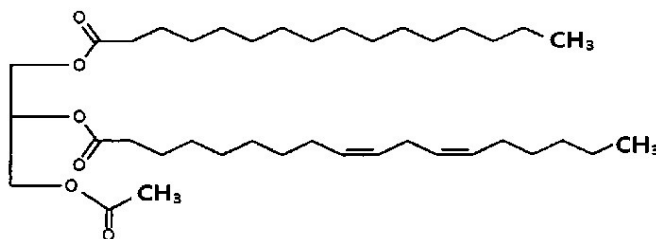
10

2. La composición de uso según la reivindicación 1, donde R1 y R2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en palmitoilo, oleoilo, linoleoilo, linoleñoilo, estearoilo, miristoilo y araquidonoilo.

3. La composición de uso según la reivindicación 1, donde R1 y R2 (R1/R2) se seleccionan del grupo que consiste en oleoilo/palmitoilo, palmitoilo/oleoilo, palmitoilo/linoleoilo, palmitoilo/linoleñoilo, palmitoilo/araquidonoilo, palmitoilo/estearoilo, palmitoilo/palmitoilo, oleoilo/estearoilo, linoleoilo/palmitoilo, linoleñoilo/estearoilo, estearoilo/linoleoilo, estearoilo/oleoilo, miristoilo/linoleoilo, miristoilo/oleoilo.

4. La composición de uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de monoacetil diacilglicerol es un compuesto de fórmula 2:

[Fórmula 2]



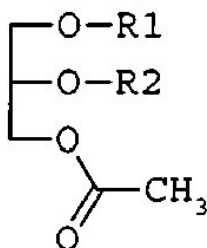
5. La composición de uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de monoacetil diacilglicerol de fórmula 1 se separa y se extrae de la cornamenta de ciervo natural.

6. La composición de uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de monoacetil diacilglicerol inhibe la secreción de IL-4.

7. La composición de uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de monoacetil diacilglicerol inhibe la activación de STAT-6.

8. La composición de uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de monoacetil diacilglicerol de fórmula 1 está en una cantidad del 0,001 al 50 % en peso de la composición.

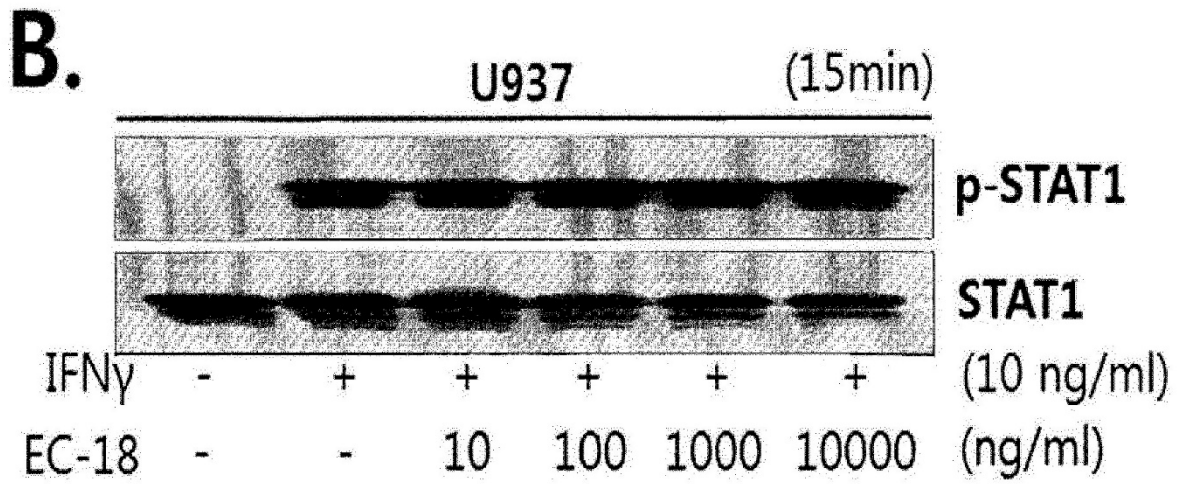
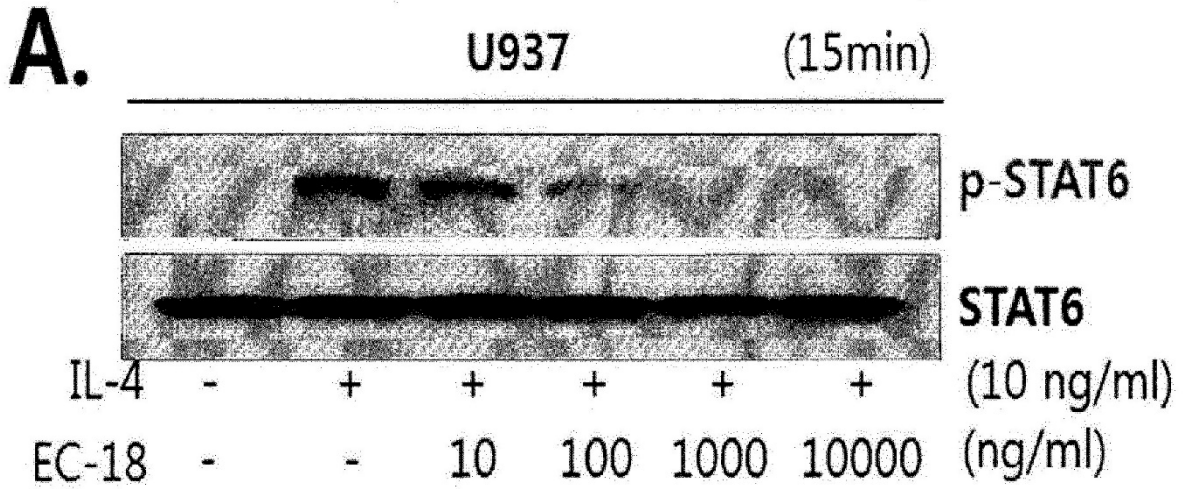
[Fórmula 1]



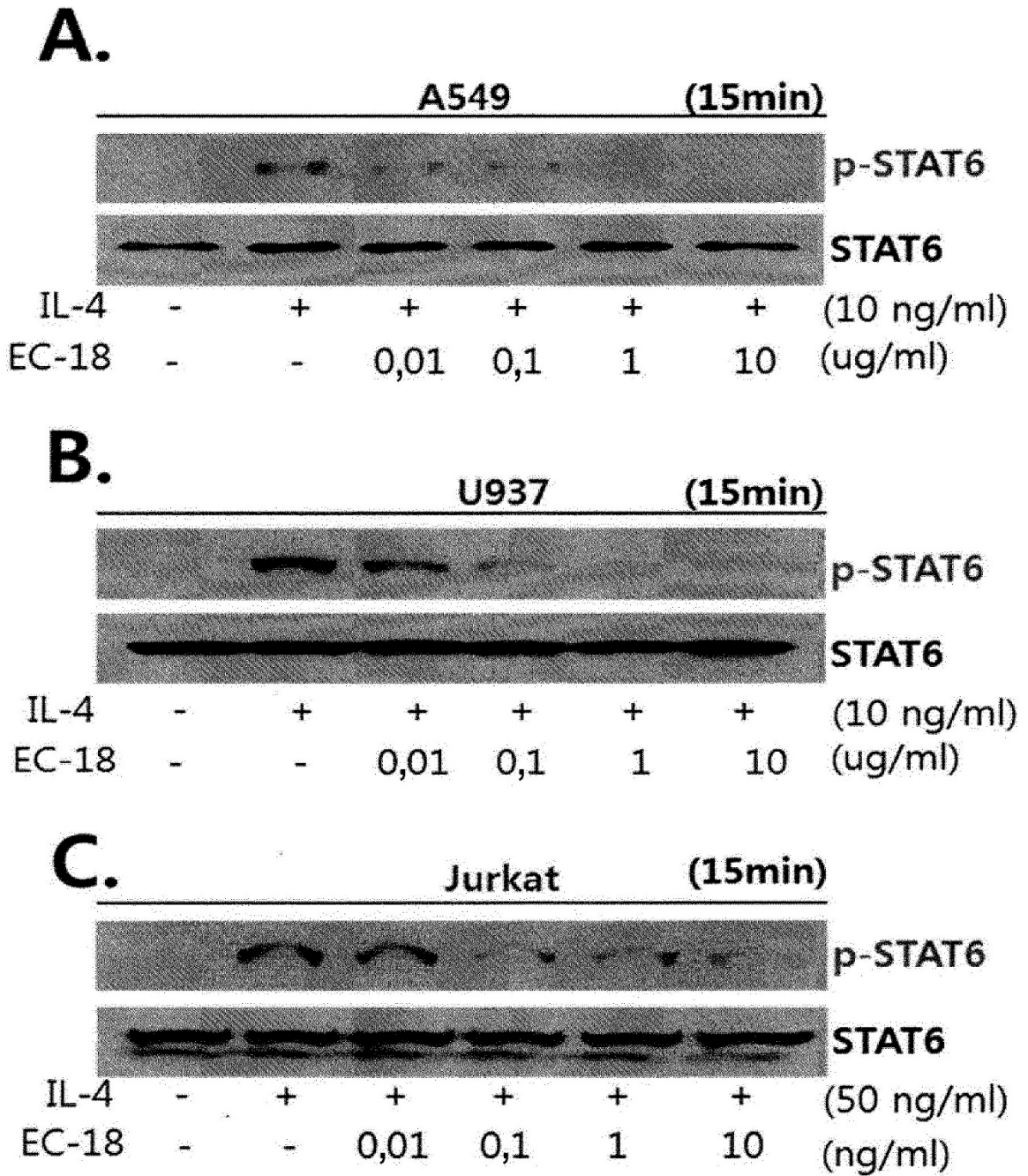
35

donde R1 y R2 son independientemente un grupo de ácido graso de 14 a 20 átomos de carbono.

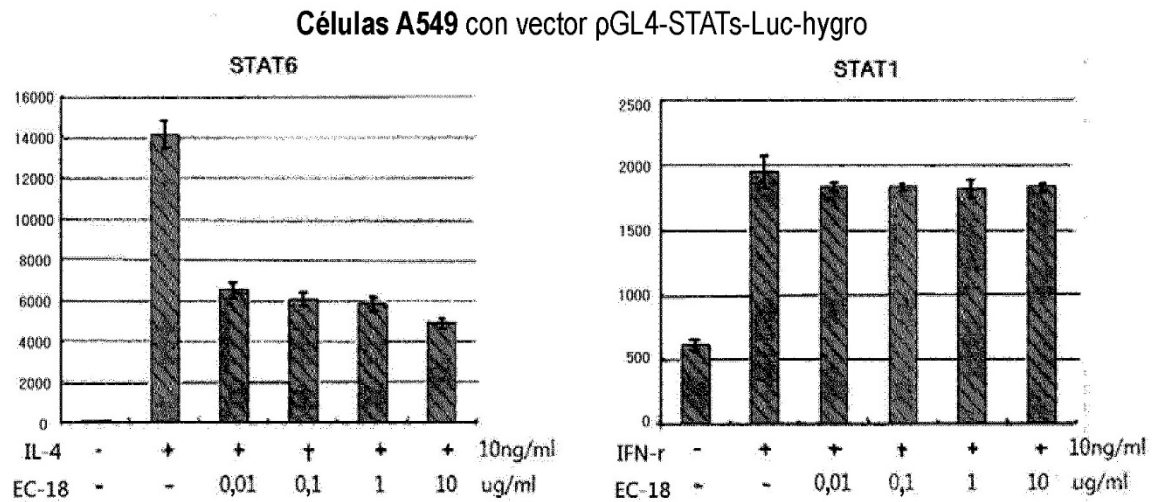
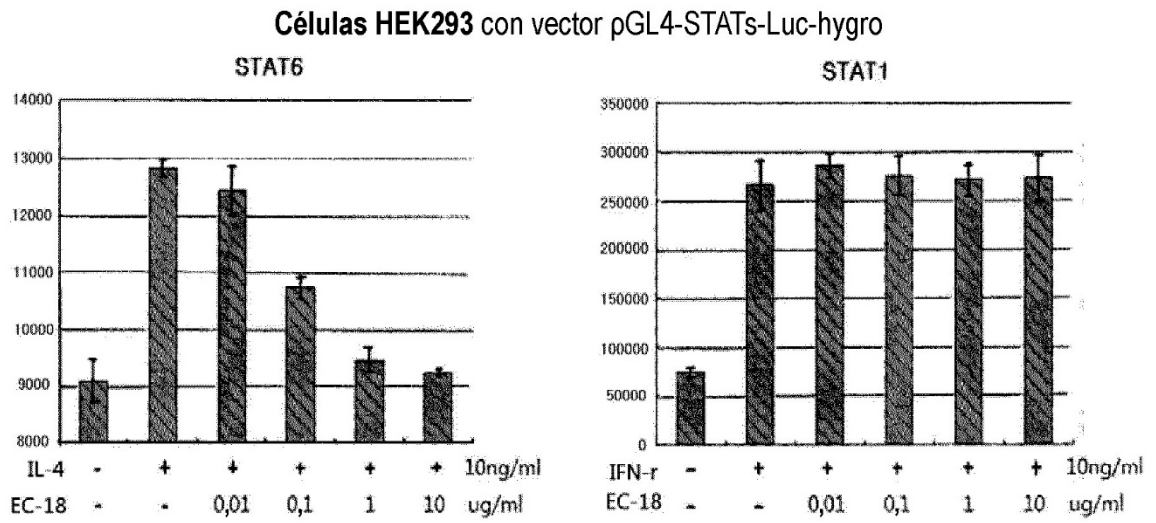
【FIG. 1】



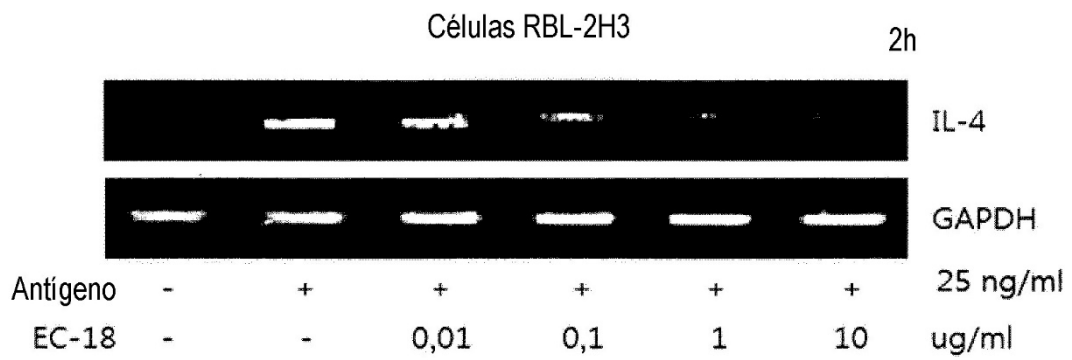
【FIG. 2】



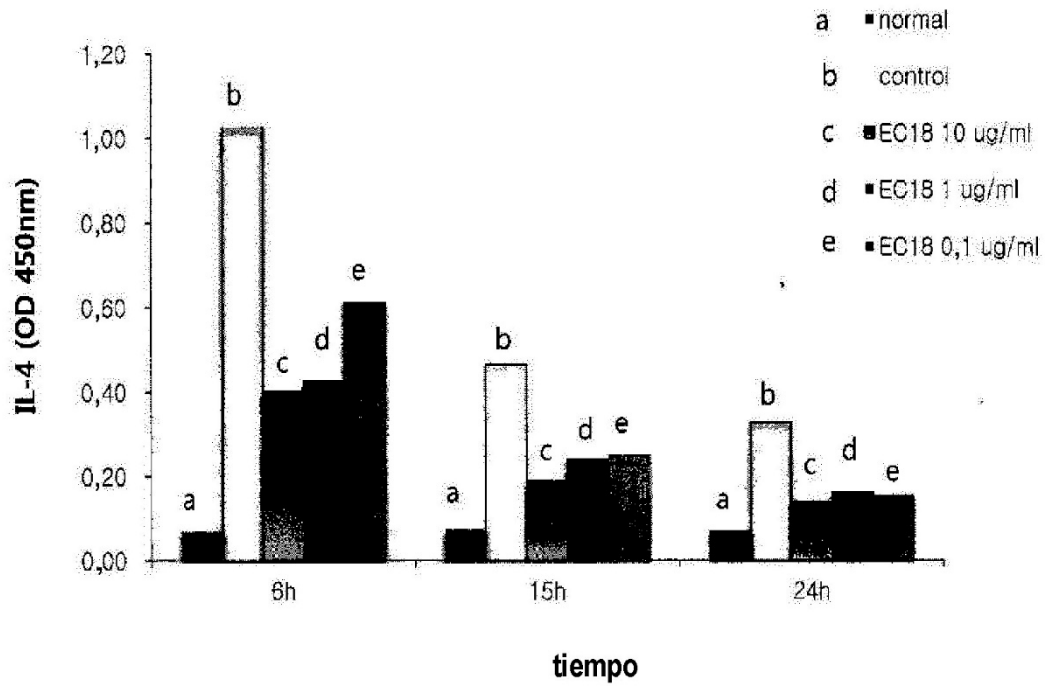
【FIG. 3】



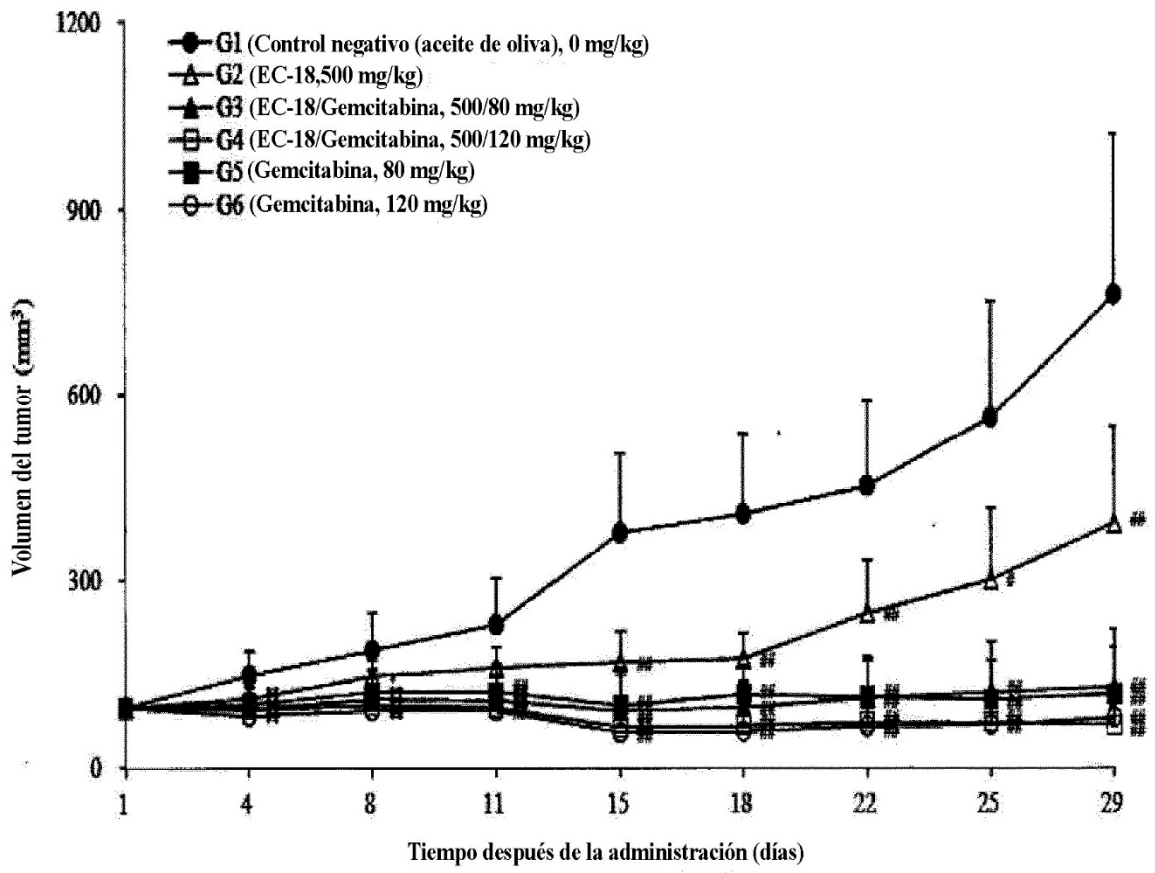
【FIG. 4】



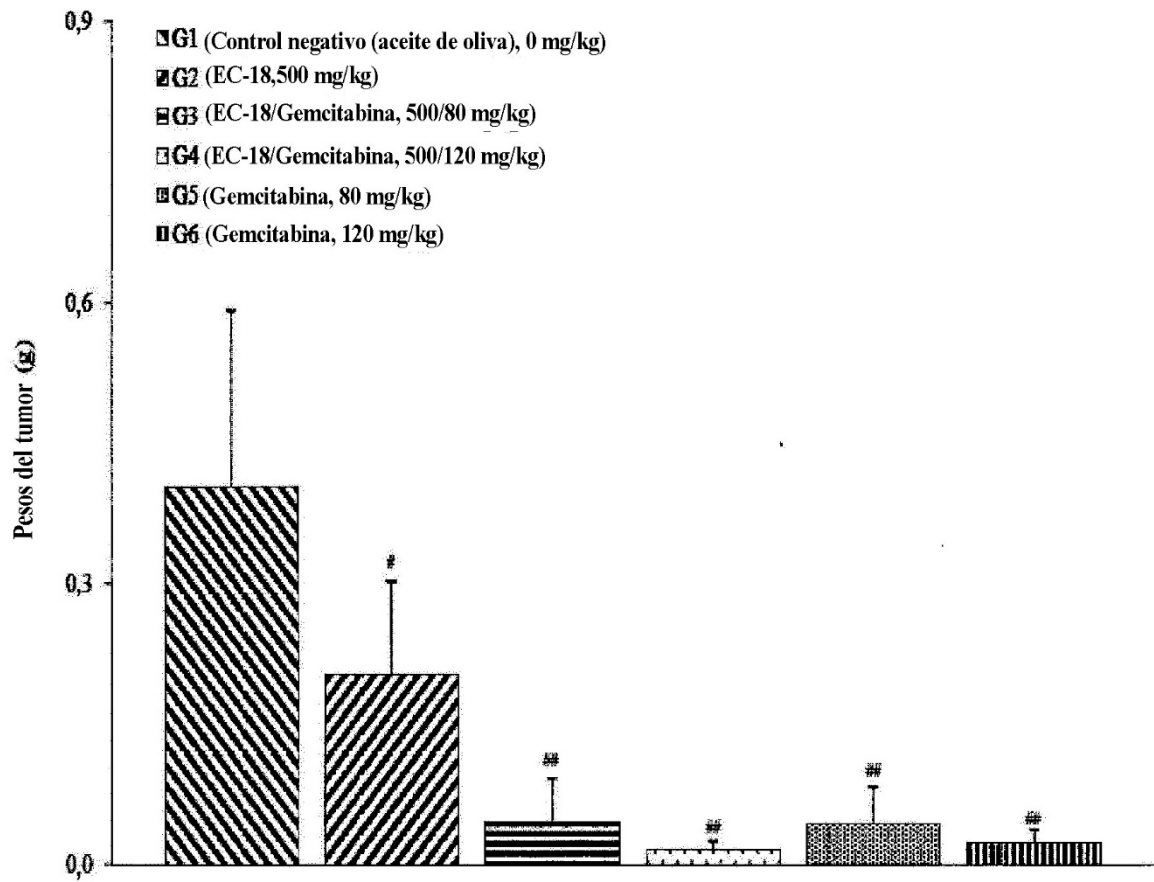
【FIG. 5】



【FIG. 6】



【FIG. 7】



【FIG. 8】

