

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 004**

51 Int. Cl.:

A61K 36/02 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2017** **PCT/CN2017/071861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017** **WO17125065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2017** **E 17741096 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3405206**

54 Título: **Composición que comprende un extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas y uso de la misma**

30 Prioridad:

20.01.2016 CN 201610037244

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2024

73 Titular/es:

**QI, QING (100.0%)
Room 8 Unit 6 Building 1 West Lane, Liulitun,
Chaoyang District
Beijing 100026, CN**

72 Inventor/es:

**QI, QING y
DING, JIAN**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 981 004 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 un extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas y uso de la misma

5 Campo técnico

La presente solicitud se refiere a un extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o a una composición que comprende el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas para usar en el tratamiento o la prevención del cáncer de páncreas.

10

Antecedentes

El cáncer de páncreas es un cáncer gastrointestinal (GI) muy maligno, que tiene muy mal pronóstico. Tanto el diagnóstico como el tratamiento del cáncer de páncreas son difíciles. Prácticamente el 90 % de los cánceres de páncreas son adenocarcinomas ductales derivados del epitelio glandular. En los últimos años, la morbilidad y la mortalidad del cáncer de páncreas están aumentando de forma significativa, y la tasa de supervivencia a cinco años es <1 %. Es uno de los tumores malignos con peor pronóstico. El cáncer de páncreas tiene una baja tasa de diagnóstico precoz, una alta mortalidad quirúrgica y una baja tasa de curación. En los últimos años, la morbilidad y la mortalidad de otros cánceres también aumentan de forma continua.

20

La clave del tratamiento de los cánceres, especialmente del cáncer de páncreas, es buscar un agente antitumoral eficaz, lo que también es objeto de estudios recientes.

Desde 1970, los investigadores han prestado cada vez más atención a las algas, especialmente a las algas verdeazuladas. Al principio, los investigadores se centraron principalmente en el valor nutritivo y la virulencia de las algas. En la reunión de la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación de 1974, la espirulina se consideraba un excelente recurso alimentario para las personas en el futuro. Los usos farmacéuticos de las algas se aprecian desde la década de 1980, y la investigación se centró principalmente en la función de diferentes extractos de algas. La investigación sobre el extracto de algas verdeazuladas, especialmente el extracto de espirulina, fue particularmente llamativa. Los inventores de esta solicitud extrajeron un extracto de proteoglicanos de las algas (véase la patente china CN1098707C). En la presente solicitud, los inventores estudiaron el efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas sobre los cánceres (especialmente el cáncer de páncreas), así como sobre el dolor (tal como el dolor asociado a los tumores) y la inflamación (tal como la inflamación asociada a los tumores).

La extracción de polisacáridos de proteínas de algas y el uso de los mismos se describen en el documento EP 1 197 218 A1. Los efectos antineoplásicos del alga verdeazulada *Spirulina platensis*, una fuente natural de compuestos tetrapirrólicos similares a la bilirrubina, son divulgados por Renata Konícková *et al.* en *Annals of Hepatology*, 1 de marzo de 2014, páginas 273-283.

40 Explicación de las invenciones

El objeto de la invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la invención se refiere a un extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas que comprende un proteoglicano o a una composición que comprende el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas para usar en el tratamiento o la prevención del cáncer de páncreas, en donde el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas se obtiene mediante las siguientes etapas:

- (a) disolver polvo de algas verdeazuladas en un volumen de agua de 5-20 veces y romper la pared celular;
- (b) calentar la mezcla resultante de la etapa (a) a una temperatura de 60-100 °C, y realizar la separación sólido-líquido tras el enfriamiento;
- (c) ajustar el pH del líquido resultante de la etapa (b) a menos de 7, y realizar de nuevo la separación sólido-líquido;
- y
- (d) ajustar el líquido resultante de la etapa (c) hasta un pH neutro, concentrando y secando si fuera necesario.

55

Se exponen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

En ciertas realizaciones, el extracto de proteoglicanos de algas y/o el extracto junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables pueden formularse en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, preferentemente formularse en líquidos orales, comprimidos, gránulos, cápsulas, polvos, píldoras, jarabes, inyecciones y similares.

60

En ciertas realizaciones, el extracto de proteoglicanos de algas se administra por vía oral, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En una realización preferida, el extracto de proteoglicanos de algas se administra por vía oral.

65

En cierta realización, la dosis del extracto de proteoglicanos de algas administrada a un sujeto es de 5-500 mg/kg de peso corporal al día. En una realización preferida, la dosis es de 10-150 mg/kg de peso corporal al día. En realizaciones más preferidas, la dosis es de 20-120 mg/kg de peso corporal al día.

5 En ciertas realizaciones, el tumor es un cáncer primario o un tumor metastásico.

La presente solicitud proporciona además los efectos de una composición antitumoral que comprende el extracto de proteoglicanos de algas sobre la inmunidad antitumoral.

10 El anterior extracto de proteoglicanos de algas se prepara de acuerdo con el método descrito en la patente china CN1098707C.

El método para preparar un extracto de proteoglicanos de algas comprende las siguientes etapas:

- 15 a. disolver polvo de algas verdeazuladas en un volumen de agua de 5-20 veces y romper la pared celular;
b. calentar la mezcla resultante de la etapa (a) hasta una temperatura de 60-100 °C, y realizar la separación sólido-líquido tras el enfriamiento;
c. ajustar el pH del líquido resultante en la etapa (b) a menos de 7, y realizar de nuevo la separación sólido-líquido;
d. ajustar el líquido resultante de la etapa (c) hasta un pH neutro, concentrando y secando si fuera necesario.

20 El contenido de proteoglicanos del extracto de proteoglicanos de algas obtenido es superior a aproximadamente el 50 % en peso, por ejemplo, superior a aproximadamente el 60 %, superior a aproximadamente el 65 %, superior a aproximadamente el 70 %, superior a aproximadamente el 75 %, y similares. En ciertas realizaciones, el contenido de proteoglicano contenido en el extracto de proteoglicano de algas es de aproximadamente el 70 %-75 % en peso.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra el protocolo del ensayo MTS utilizado para detectar la proliferación de la línea celular PANC-1.

30 La figura 2 muestra el porcentaje de proliferación de las células PANC-1 tras ser tratadas con diferentes concentraciones de extracto de proteoglicanos de algas el día 1(D1), día 2(D2), día 3(D3), día 4(D4) y día 6(D6), en comparación con el control.

La figura 3 muestra los cambios en la imagen por TAC del páncreas en un paciente con cáncer de páncreas avanzado tras tomar el extracto de proteoglicanos de algas durante 3 meses.

35 **Descripción detallada de las invenciones**

La presente solicitud proporciona un extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o una composición que comprende el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas para usar en el tratamiento o la prevención del cáncer de páncreas de acuerdo con la reivindicación 1.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable" divulgado en el presente documento se refiere a un vehículo que no interfiere con la bioactividad de los principios activos, incluidos los utilizados habitualmente en el campo farmacéutico. El vehículo farmacéuticamente aceptable divulgado en el presente documento puede ser sólido o líquido, incluidos los
45 excipientes, tampones, emulsionantes, estabilizantes, conservantes, diluyentes, encapsulantes, materiales de relleno y similares farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, el tampón farmacéuticamente aceptable comprende además fosfatos, acetatos, citratos, boratos, carbonatos y similares.

La composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede presentarse en forma de una dosis unitaria,
50 y puede prepararse mediante cualquier método bien conocido en el campo farmacéutico. Todos los métodos comprenden la etapa de combinar los principios activos divulgados en el presente documento con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Generalmente, se prepara una composición combinando los principios activos con un vehículo líquido o sólido, o ambos, a continuación se da forma al producto resultante según sea necesario.

55 En ciertas realizaciones, el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento y/o el extracto junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden formularse en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, líquido oral, cápsula, polvo, comprimido, gránulo, píldora, jarabe, inyección, supositorios y similares.

60 El extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento se prepara de acuerdo con el método descrito en la patente china CN1098707C.

En ciertas realizaciones, el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento se administra a una dosis de 5-500 mg/kg de peso corporal al día, preferentemente de 20-150 mg/kg de peso corporal al día, más
65 preferentemente de 20-120 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo, 20 mg/kg de peso corporal al día, 30mg/kg de

peso corporal al día, 60mg/kg de peso corporal al día, 120 mg/kg de peso corporal al día, y similares.

El término "tratar" o "tratamiento" utilizado en el presente documento incluye inhibir, curar, aliviar o mitigar el cáncer, el dolor (tal como el dolor asociado a un tumor) o la inflamación (tal como la inflamación asociada a un tumor) o enfermedades mediadas por factores inflamatorios, así como prevenir o retrasar la metástasis de un cáncer primario.

En ciertas realizaciones, el cáncer puede ser un cáncer primario, y también puede ser un cáncer metastásico.

La "cantidad terapéuticamente efectiva" o la "cantidad profilácticamente efectiva" utilizadas en el presente documento pueden determinarse según el caso, y pueden ser manejadas fácilmente por una persona con conocimientos ordinarios en la materia en función de la dosis realmente necesaria, por ejemplo, que se determina de acuerdo con el peso corporal, la edad y las condiciones de un paciente. Como ninguno de los ingredientes que contiene el extracto es tóxico, el propio extracto puede administrarse directamente según las necesidades, cuando la composición no comprenda un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cuando la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, el extracto y el vehículo pueden mezclarse mediante los métodos convencionales del campo farmacéutico para fabricar el medicamento requerido.

En ciertas realizaciones, el extracto de proteoglicanos de algas o una composición que comprende el extracto de proteoglicanos de algas se administra por vía oral, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En las realizaciones preferidas, el extracto de proteoglicanos de algas o una composición que comprende el extracto de proteoglicanos de algas se administra por vía oral.

La presente solicitud proporciona además una composición farmacéutica que comprende un extracto de proteoglicanos de algas y uno o más de otros agentes antitumorales (de acuerdo con la invención en la medida en que esté abarcada por las reivindicaciones).

Los anteriores agentes antitumorales incluyen los utilizados en clínica para el tratamiento de tumores, por ejemplo, inhibidores de la síntesis de nucleótidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU)); antibióticos antitumorales (por ejemplo, adriamicina (ADM)); compuestos de platino (por ejemplo, carboplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida y nitrosourea, tal como carmustina); inhibidores de la ADN polimerasa (por ejemplo, gemcitabina); agentes que interfieren en la síntesis de proteínas (por ejemplo, etopósido (VP-16)); y similares (de acuerdo con la invención en la medida en que estén abarcados por las reivindicaciones).

Cuando el extracto de proteoglicanos de algas se administra junto con uno o más de otros agentes antitumorales, el efecto antitumoral aumenta significativamente, presentando un efecto sinérgico. El efecto sinérgico de la combiterapia (por ejemplo, la combinación del extracto de proteoglicanos de algas y uno o más de otros agentes antitumorales) permite administrar a un sujeto que padece un cierto trastorno (tal como cáncer o los síntomas asociados al mismo) una dosis menor que la de cada terapia por separado, y/o reducir la frecuencia de administración de la terapia.

El término "sujeto" como se utiliza en el presente documento se refiere a un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, primates, bóvidos, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos y roedores, tales como ratas y ratones.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las expresiones "comprende/que comprende/comprendiendo", "incluye/que incluye/incluyendo" y "contiene/que contiene/conteniendo" significan "incluyendo pero sin limitación", y no pretenden excluir otras partes, aditivos, componentes o etapas.

Debe entenderse que los rasgos distintivos, características, componentes o etapas descritos en los aspectos, realizaciones o ejemplos específicos de la presente solicitud pueden aplicarse a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, salvo que se indique lo contrario.

Las divulgaciones anteriores describen las invenciones en general, y los ejemplos siguientes ilustran aún más las invenciones. Estos ejemplos descritos pretenden únicamente ilustrar las invenciones, pero no se consideran ninguna limitación a las invenciones.

A menos que se indique específicamente, los métodos y las técnicas experimentales de la memoria descriptiva son métodos y técnicas bien conocidos por un experto en la materia.

Ejemplos

Ejemplo 1 Efecto inhibidor del extracto de proteoglicanos de algas en el carcinoma de páncreas

Ejemplo 1.1 El extracto de proteoglicanos de algas inhibió la proliferación de células de carcinoma de páncreas PANC-1

Línea celular y cultivo celular

En este estudio, utilizamos una línea celular de carcinoma de páncreas, PANC-1. Esta línea celular es cultivada por AnyGenes®. Se realizaron varios pases para garantizar la viabilidad celular y disponer de la cantidad necesaria de células para realizar los diferentes experimentos (ensayos MTS y análisis SignArrays®). La información relativa a la línea celular PANC-1 se describe en la Tabla 1.

Tabla 1

Línea celular	Organismo	Tipo	Características	Origen
PANC-1	<i>Homo sapiens</i>	Páncreas	Carcinoma epiteliode	ATCC® RL-1469™

Las células PANC-1 se cultivaron en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco; Gibco® de Life Technologies™) suplementado con un 10 % de FBS (suero bovino fetal; Gibco® de Life Technologies™), 1 % de L-glutamina (200 mM; Gibco® de Life Technologies™), 1 % de piruvato de sodio (100 mM; Gibco® de Life Technologies™), 1 % de estreptomicina-penicilina (10 000 U/ml de penicilina y 10 000 µg/ml de estreptomicina; Gibco® de Life Technologies™) y se incubaron a 37 °C bajo un 5 % de CO₂. La viabilidad celular se determinará mediante el ensayo de exclusión con azul tripano.

Preparación del extracto de proteoglicanos de algas

Se enjuagaron 3 kg de polvo seco de espirulina con 3 litros de agua y se filtraron por succión. A continuación, se añadieron 30 litros de agua al residuo resultante y la mezcla se agitó. La mezcla se calentó a 88 °C durante 1 hora, se enfrió y a continuación se filtró a presión reducida. El filtrado se ajustó con ácido clorhídrico a pH 3,8, a continuación se apartó toda la noche para la separación por centrifugación. El sobrenadante se ajustó con una solución de Na₂CO₃ a pH 7 y, a continuación, se secó por pulverización para obtener 0,599 kg de extracto de proteoglicanos de algas. Se comprobó que el contenido de proteoglicanos en el extracto era del 72,3 %.

El extracto de proteoglicanos de algas se pesa en condiciones estériles y se disuelve en 50 mg/ml de PBS para obtener la solución madre. Después de centrifugar a 2500g durante 30 minutos, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. En un ensayo MTS, la solución se diluyó en un medio para tratar las células. En las siguientes partes, el extracto de proteoglicanos de algas también se denomina "extracto K".

Ensayo MTS

La prueba de proliferación celular se realizó utilizando el ensayo CellTiter 96® Aqueous None Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS; Promega), basado en el método colorimétrico, para determinar el número de células viables en proliferación.

Este kit de ensayo se compone de soluciones de una sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio); MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones (metosulfato de fenazina; PMS) para aumentar la estabilidad química del compuesto. El MTS es reducido por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas a un producto coloreado soluble en el medio de cultivo: el formazán. La cantidad de producto de formazán se mide después de 2 horas de incubación a 37 °C por la cantidad de absorbancia a 490 nm, que es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Finalmente, se determinó la concentración inhibidora semimáxima (CI50) del extracto de proteoglicanos de algas con el modelo experimental de células PANC-1. Todas las condiciones de cultivo celular se realizan por triplicado.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (Microtest 96®; Falcon) el día -1 (D1) (1500 células por pocillo en 100 µl de medio), posteriormente se trataron dentro del intervalo de concentración preseleccionado. En particular, se seleccionan 10 concentraciones diferentes para el extracto de proteoglicanos de algas, tres pocillos para cada concentración. Los pocillos sin células sin adición de extracto de proteoglicanos de algas se utilizan como pocillos de control.

Justo antes de añadir la solución MTS, se retiró el medio de cultivo celular con o sin tratamiento para evitar interferencias del extracto de proteoglicanos de algas con este ensayo, y se añadieron 100 µl de medio a cada pocillo. A continuación, se añadieron 20 µl de solución MTS en cada pocillo y se midió la absorbancia a 490 nm después de 4 horas de incubación a 37 °C bajo un 5 % de CO₂. El medio de cultivo celular con o sin el extracto de proteoglicanos de algas se cambió los días D2 (Día-2) y D4 (Día-4). Los valores de la DO a 490 nm se midieron los días D0, D1, D2, D3, D4 y D6, correspondiente al análisis global de placas de 6 × 96 pocillos (una vez al día), como se ilustra en la Figura 1.

Resultados del ensayo de proliferación celular en la línea celular PANC-1

Resultados del MTS en el D0

Se midieron los valores de la DO en el D0 para comprobar si la siembra de células del día anterior se había realizado

de forma adecuada y si el protocolo adaptado funcionaba en esta línea celular. La Tabla 2 indica los valores de la DO en el D0. Podemos observar que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los valores de la DO, lo que indicaba que la siembra de células era correcta y que los resultados eran repetibles.

5

Tabla 2

	Valor de la DO						Valor medio	DE	Valor medio total	DE total
Día 0	0,507	0,476	0,499	0,491	0,49	0,494	0,494	0,01035	0,499	0,01063
	0,496	0,495	0,508	0,493	0,48	0,5	0,497	0,00706		
	0,488	0,515	0,497	0,511	0,50	0,519	0,506	0,01169		

Efecto antiproliferativo del extracto de proteoglicanos de algas en la línea celular PANC-1

Los valores de la DO correspondientes a diferentes concentraciones del extracto de proteoglicanos de algas se
10 presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Extracto K (mg/ml)		0	5	3,5	2,5	1,75	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	control sin células
Día 1	Valor de la DO	0,483	0,453	0,456	0,463	0,476	0,498	0,569	0,535	0,555	0,537	0,532	0,387
		0,542	0,461	0,468	0,464	0,477	0,525	0,535	0,532	0,54	0,559	0,48	0,386
	valor medio	0,5	0,475	0,439	0,458	0,48	0,521	0,549	0,523	0,529	0,553	0,494	0,385
Día 2	DE	0,508	0,463	0,454	0,462	0,478	0,515	0,551	0,530	0,541	0,550	0,502	0,386
		0,030	0,0111	0,0146	0,0032	0,0021	0,0146	0,0171	0,0062	0,0131	0,0114	0,0269	0,0010
	en el valor	0,653	0,41	0,463	0,451	0,474	0,592	0,522	0,59	0,518	0,557	0,642	0,382
Día 3	DE	0,691	0,42	0,506	0,441	0,433	0,61	0,499	0,611	0,533	0,605	0,597	0,382
		0,656	0,416	0,439	0,462	0,515	0,608	0,598	0,554	0,557	0,58	0,479	
	valor medio	0,667	0,415	0,469	0,451	0,474	0,603	0,540	0,585	0,536	0,581	0,573	0,382
Día 4	DE	0,021	0,0050	0,0340	0,0105	0,0410	0,0099	0,0518	0,0288	0,0197	0,0240	0,0842	0,0000
		0,609	0,395	0,385	0,393	0,47	0,458	0,583	0,519	0,544	0,549	0,51	0,394
	en el valor	0,63	0,387	0,407	0,393	0,612	0,605	0,547	0,611	0,558	0,554	0,549	0,386
Día 6	DE	0,52	0,407	0,401	0,392	0,527	0,462	0,612	0,626	0,523	0,481	0,473	0,383
		0,586	0,396	0,398	0,393	0,536	0,508	0,581	0,585	0,542	0,528	0,511	0,388
	valor medio	0,058	0,0101	0,0114	0,0006	0,0715	0,0838	0,0326	0,0580	0,0176	0,0408	0,0380	0,0057
Día 6	DE	0,727	0,386	0,374	0,378	0,392	0,492	0,587	0,698	0,579	0,604	0,635	0,369
		0,74	0,386	0,397	0,385	0,399	0,453	0,561	0,656	0,651	0,651	0,624	0,375
	valor medio	0,725	0,38	0,383	0,386	0,405	0,412	0,637	0,658	0,55	0,625	0,61	0,365
Día 6	DE	0,731	0,384	0,385	0,383	0,399	0,452	0,595	0,671	0,593	0,627	0,623	0,370
		0,008	0,0035	0,0116	0,0043	0,0065	0,0400	0,0386	0,0237	0,0520	0,0235	0,0125	0,0050
	valor medio	0,619	0,373	0,361	0,377	0,375	0,376	0,508	0,627	0,637	0,532	0,558	0,359
Día 6	DE	0,605	0,38	0,389	0,384	0,382	0,397	0,457	0,539	0,608	0,638	0,621	0,374
		0,598	0,36	0,384	0,359	0,381	0,423	0,516	0,491	0,52	0,563	0,72	0,367
	valor medio	0,607	0,371	0,378	0,373	0,379	0,399	0,494	0,552	0,588	0,578	0,633	0,367
Día 6	DE	0,010	0,0102	0,0149	0,0129	0,0038	0,0235	0,0320	0,0690	0,0609	0,0545	0,817	0,0075
	valor medio												

Tras el cálculo, se determinó el porcentaje de células en proliferación frente al control (sin extracto K). Tras el tratamiento con diferentes concentraciones del extracto de proteoglicanos de algas cada día, el porcentaje de proliferación celular de la línea celular PANC-1 frente al control se presentó en la Tabla 4 y en la Figura 2. La Tabla 5 demostró el efecto inhibidor del extracto de proteoglicanos de algas sobre la proliferación de las células PANC-1. El porcentaje de inhibición se calculó comparando el número de células supervivientes tras el tratamiento con el extracto K con el número de células supervivientes sin tratamiento.

Tabla 4

Extracto K (mg/ml)	Porcentaje de proliferación celular frente al control (%)										
	0	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1	1,75	2,5	3,5	5
D1	100	94,82	133,79	126,98	117,71	134,88	105,18	74,93	61,85	55,86	62,94
D2	100	66,98	69,79	54,10	71,31	55,39	77,75	32,32	24,36	30,68	11,71
D3	100	61,91	70,64	77,52	99,50	97,15	60,74	55,79	2,52	5,03	4,36
D4	100	70,18	71,19	61,96	83,38	62,42	22,90	8,03	3,69	4,16	3,97
D6	100	110,66	87,67	92,11	77,15	52,77	13,30	5,26	2,77	4,71	1,80

10

Tabla 5

Extracto K (mg/ml)	Porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente al control (%)										
	0	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1	1,75	2,5	3,5	5
D1	0	5,18	-33,79	-26,98	-17,71	-34,88	-5,18	25,07	38,15	44,14	37,06
D2	0	33,02	30,21	45,90	28,69	44,61	22,25	67,68	75,64	69,32	88,29
D3	0	38,09	29,36	22,48	0,50	2,85	39,26	44,21	97,48	94,97	95,64
D4	0	29,82	28,81	38,04	16,62	37,58	77,10	91,97	96,31	95,84	96,03
D6	0	-10,66	12,33	7,89	22,85	47,23	86,70	94,74	97,23	95,29	98,20

Se observó un efecto antiproliferativo significativo del extracto de proteoglicanos de algas sobre las células PANC-1 tras el tratamiento con 1,75 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,5 mg/ml o 5 mg/ml de extracto K en el D1, D2, D3, D4 o D6. Por ejemplo, el porcentaje de inhibición para 2,5 mg/ml de extracto K en el D1 fue del 38,15 %, y el porcentaje de inhibición para 5 mg/ml de extracto K en el D1 fue del 37,06 %; el porcentaje de inhibición para 2,5 mg/ml de extracto K en el D2 fue del 75,64 %, y el porcentaje de inhibición para 5 mg/ml de extracto K en el D2 fue del 88,29 %; y 1,75 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,5 mg/ml y 5 mg/ml de extracto K inhibieron significativamente la proliferación de las células PANC-1 con un porcentaje de inhibición superior al 90 %.

20 El valor de la CI50 del extracto de proteoglicanos de algas es >5 mg/ml en el D1, y entre 1 y 1,75 mg/ml en el D2.

Los resultados anteriores demostraron que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento tiene un notable efecto inhibidor sobre las células de carcinoma de páncreas PANC-1.

25 Ejemplo 1.2 Caso clínico de extracto de proteoglicanos de algas para el tratamiento de pacientes con carcinoma de páncreas avanzado

Estado del paciente: varón, nacido en 1927, endoprótesis vascular (stent) coronaria en 1996 para el tratamiento del infarto agudo de miocardio; implantación de marcapasos cardíaco en 2003 para el tratamiento de la bradicardia; se encontró una masa en la cabeza del páncreas el 3 de diciembre de 2013 por detección ecográfica para el tratamiento de un síntoma febril; y se diagnosticó un carcinoma de páncreas avanzado poco diferenciado mediante biopsia percutánea con aguja gruesa guiada por ecografía de la masa de la cabeza del páncreas el 26 de diciembre de 2013. El 14 de enero de 2014, se realizaron un PTCD + colocación de una endoprótesis vascular biliar. El extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 se administró al paciente el 15 de diciembre de 2013, 1350 mg/día, se aumentó hasta 2025 mg/día después de 20 días. El paciente no recibió ningún otro tratamiento.

Observación de la eficacia clínica: el estado del paciente se estabilizó tras una remisión parcial (PR), y la supervivencia global fue de 20 meses.

40 La figura 3 mostraba los cambios en las imágenes por TAC del páncreas del paciente tras la administración del extracto de proteoglicanos de algas durante tres meses. La imagen de la fase arterial mostró que el tumor se redujo de 46 × 51 mm a 35 × 46 mm después de 3 meses. Las imágenes de la fase venosa mostraron que la densidad de la zona necrótica central se había reducido significativamente. Esto confirmó adicionalmente que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento puede utilizarse para el tratamiento del carcinoma de páncreas, y tiene un efecto inhibidor significativo en el carcinoma de páncreas avanzado.

El carcinoma de páncreas es un cáncer del tubo digestivo muy maligno. Los pacientes con carcinoma de páncreas tendrán una supervivencia de aproximadamente 4 meses sin ningún tratamiento, o de 16 meses tras la resección. Sin embargo, debido a la baja tasa de diagnóstico del carcinoma de páncreas precoz, la mayoría de los casos se han desarrollado hasta el estadio avanzado cuando se realiza el diagnóstico, y no son aptos para el tratamiento quirúrgico.

Las terapias farmacológicas existentes no pueden prolongar eficazmente la supervivencia de los pacientes. Los inventores resumieron los efectos de las terapias farmacológicas recogidas en la bibliografía del estado de la técnica (Tabla 6). En la Tabla 6 puede observarse que incluso con la combiterapia, la supervivencia global era como máximo de 9 meses. Sorprendentemente, el paciente con carcinoma de páncreas avanzado de este Ejemplo, después de 5 tomar el extracto de proteoglicanos de algas, obtuvo una inesperada supervivencia global de 20 meses. Esto demuestra que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento es significativamente superior a las terapias farmacológicas existentes en el tratamiento de pacientes con carcinoma de páncreas, y este efecto es inesperado.

10

Tabla 6

Investigador	Número de casos	Esquema experimental	Supervivencia global
Berlin et al	322	Gemcitabina frente a gemcitabina + 5-FU	5,4 frente a 6,7 meses (p = 0,09)
Rocha Lima et al	342	Gemcitabina frente a gemcitabina + irinotecán	6,3 frente a 6,6 meses (p = 0,79)
Louvet et al	313	Gemcitabina frente a gemcitabina + oxaliplatino	7,1 frente a 9,0 meses (p = 0,13)
Oettle et al	565	Gemcitabina frente a gemcitabina + irinotecán	6,3 frente a 6,2 meses (p = 0,79)
Heinemann et al	195	Gemcitabina frente a gemcitabina + cisplatino	6,0 frente a 7,5 meses (p = 0,15)
Starhopoulos et al	145	Gemcitabina frente a gemcitabina + irinotecán	6,4 frente a 6,5 meses (p = 0,97)
Abou-Alfa et al	349	Gemcitabina frente a gemcitabina + exatecán	6,2 frente a 6,7 meses (p = 0,52)
Hermann et al	319	Gemcitabina frente a gemcitabina + capecitabina	7,2 frente a 8,4 meses (p = 0,234)
Cunningham et al	533	Gemcitabina frente a gemcitabina + capecitabina	7,1 frente a 6,2 meses (p = 0,08)
Poplon et al	832	Gemcitabina frente a gemcitabina FDR. frente a gemcitabina + oxaliplatino	4,9 frente a 6,2 meses (p = 0,04) frente a 5,7 meses (p = 0,22)
Colucci et al	400	Gemcitabina frente a gemcitabina + eisplatino	7,2 frente a 8,2 meses (p = 0,38)

Ejemplo 2 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el cáncer de hígado (Ejemplo de referencia)

15 En este ejemplo, se analizó el efecto del extracto de proteoglicanos de algas en el tiempo medio de supervivencia de 11 pacientes con carcinoma hepatocelular.

Se trataron once pacientes con carcinoma hepatocelular con el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 (1080 mg/día), hasta que el paciente muriera o la administración oral resultara irrealizable.

20 Los tiempos de supervivencia de todos los casos fueron de 2~43 meses, y la mediana del tiempo de supervivencia fue de 15,2 meses para 11 pacientes con CHC. El mayor tiempo de supervivencia fue de 43 meses, 4 pacientes obtuvieron un tiempo de supervivencia superior a 20 meses, 8 pacientes obtuvieron un tiempo de supervivencia superior a 11 meses, 9 pacientes obtuvieron un tiempo de supervivencia superior a 6 meses y 1 paciente obtuvo un tiempo de supervivencia inferior a 3 meses. En estos casos, a un paciente especial recomendado por la Anhui Charity Federation, ZBFU del Anhui Hospital, se le diagnosticó un cáncer primario de hígado el 2 de agosto de 2005, T2N0M0, estadio II, con lesión ocupante de espacio de 3,0 × 3,7 cm en el lóbulo derecho del hígado; y por esplenomegalia, cirrosis hepática, cálculo en el riñón izquierdo acompañado de hemorragia, no se administró ningún otro tratamiento. Este paciente entró en el estudio el 24 de septiembre de 2005 y comenzó a tomar el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1. ZBFU murió el 6 de abril de 2009. Este paciente tomó el extracto de 30 proteoglicanos de algas de forma continuada y sobrevivió 43 meses.

El tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer de hígado ha sido el problema más difícil en el tratamiento del cáncer de hígado. Diferentes quimioterapias para pacientes inoperables únicamente pueden prolongar la mediana del tiempo de supervivencia en 1-2 meses. En la actualidad, la medicación convencional para el cáncer de hígado es el 35 sorafenib (nombre comercial: NEXAVAR), con una mediana del tiempo de supervivencia de 10,7 meses y de 7,9 meses en el grupo de tratamiento y en el grupo de control con placebo, respectivamente. Sin embargo, en este Ejemplo, después de tomar el extracto de proteoglicanos de algas, los pacientes con cáncer de hígado tienen una mediana del tiempo de supervivencia de 15,2 meses. Esto demuestra que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento es significativamente superior al medicamento existente para el tratamiento del 40 cáncer de hígado.

Ejemplo 3 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el cáncer de colon (Ejemplo de referencia)

En este ejemplo, se analizó el efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en ocho pacientes con cáncer de colon.

De estos 8 pacientes con cáncer de colon, 2 pacientes son varones y 6 son mujeres, de 38 a 68 años, y la mediana de edad es de 60,5 años; y la calificación de la condición física variaba entre 70 y 90. Dos pacientes padecían cáncer de colon en estadio clínico III y seis pacientes padecían cáncer de colon en estadio clínico IV; por lo que todos los casos eran tumores en estadio clínico III o IV. Se diagnosticaron patológicamente 8 casos (8 de los cuales fueron intervenidos quirúrgicamente).

Estado general de los sujetos con cáncer de colon

Género	Masculino	2 casos	25,00 %
	Femenino	6 casos	75,00 %
Edad (años)	Intervalo	38-68	
	Mediana de la edad	60,5	
	>65	2 casos	25,00 %
	≤65	6 casos	75,00 %
	>80	4 casos	50,00 %
Calificación de la condición física	70-80	4 casos	50,00 %
	Mediana de la KPS	85	
	Patología	8 casos	100,00 %
Método de diagnóstico	Cirugía + quimioterapia	3 casos	37,50 %
	Cirugía + radioterapia + quimioterapia	5 casos	62,50 %
Recidiva y metástasis	Recaída	2 casos	25,00 %
	Metástasis a distancia	6 casos	75,00 %
Estadio	IIIA/IIIB	2 casos	25,00 %
	IV	6 casos	75,00 %

Ocho pacientes con cáncer de colon tomaron el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 a una dosis de 1080 mg/día. Después de 56 días de tratamiento, 1 caso mostró una remisión parcial (PR), 3 casos mostraron una enfermedad estabilizada (SD), 4 casos mostraron una enfermedad progresiva (PD). La tasa de eficacia (RC+PR/número total de casos) para el tratamiento de los ocho casos de cáncer de colon fue del 12,5 %, y la tasa de control de la enfermedad (RC+PR+SD/número total de casos) fue del 50 %.

Ejemplo 4 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el cáncer gástrico (Ejemplo de referencia)

También se estudió el efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en pacientes con cáncer gástrico.

De tres pacientes con cáncer gástrico, todos eran varones, de 57 a 67 años, con una mediana de edad de 65 años. Los tres pacientes se encontraban en estadio avanzado, en los que 2 casos eran tumores en estadio clínico III y 1 caso era un tumor en estadio clínico IV; y el tipo de tejido de todos los casos era un adenocarcinoma. Los tres casos fueron diagnosticados patológicamente (incluyendo 1 caso sometido a biopsia y 2 casos intervenidos quirúrgicamente).

Los tres pacientes con cáncer gástrico tomaron el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 a una dosis de 1080 mg/día. Después de 56 días de tratamiento, 2 casos mostraron una enfermedad estabilizada (SD), 1 caso mostró una enfermedad progresiva (PD), y la tasa de control de la enfermedad fue del 66,7 %.

Ejemplo 5 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el linfoma (Ejemplo de referencia)

En este ejemplo, se analizó el efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en pacientes con linfoma.

Estado del paciente: mujer de 62 años, con un diagnóstico de linfoma no hodgkiniano NHL (difuso de linfocitos B grandes), en estadio IVB (tumor en estadio terminal). El tratamiento previo incluyó 6 ciclos de quimioterapia CHOP, 8 ciclos de quimioterapia IMVP-16 y 2 ciclos de quimioterapia HDARA-c + VP-16. Después del tratamiento anterior, se encontró una masa de 3 × 2 cm en la región submandibular izquierda.

Desde el 2 de marzo de 2003, los pacientes con linfoma no hodgkiniano difuso de linfocitos B grandes que habían recaído tras múltiples quimioterapias empezaron a tomar los extractos de proteoglicanos de algas preparados de acuerdo con el Ejemplo 1.1 por vía oral a una dosis de 2700 mg/día, tres veces al día. El 31 de marzo de 2003, el

tamaño de la lesión se había reducido hasta 1,5 × 1,8 cm. La eficacia clínica se evaluó como remisión parcial (PR).

La paciente mencionada con linfoma no hodgkiniano difuso de linfocitos B grandes recidivante tras múltiples quimioterapias logró una remisión parcial tras 28 días de tratamiento con el extracto de proteoglicanos de algas, lo que demuestra que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento tiene un efecto terapéutico significativo en el linfoma.

Ejemplo 6 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el cáncer de esófago (Ejemplo de referencia)

En este ejemplo, se analizó el efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en pacientes con cáncer de esófago.

En el estudio participaron dos pacientes con cáncer de esófago con una calificación de la condición física de 80, y ambos se encontraban en un estadio avanzado (estadio III y estadio IV), con metástasis a distancia. Tras el tratamiento con el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1, un caso mostró una remisión parcial (PR) y el otro una enfermedad estabilizada (SD), como se muestra en la siguiente tabla.

Evaluación tumoral de pacientes evaluables con cáncer de esófago

N.º	Nombre abreviado	N.º de serie	Estadio tumoral	Tipo de tejido	Efecto terapéutico
1	SXFA	3	IV	Adenocarcinoma	SD
2	ZSCA	2	IV	Carcinoma de células escamosas	PR

Después, se describieron las condiciones específicas de los dos pacientes.

Paciente SXFA, varón, nacido el 19 de marzo de 1941, su estado y tratamiento fueron los siguientes:

mediante una biopsia tisular se le diagnosticó al paciente un adenocarcinoma de esófago poco diferenciado, estadio IV, el 10 de noviembre de 2005.

El 8 de noviembre de 2005, el resultado del TAC mostró un levantamiento nodular de 6 cm de longitud en la mucosa situado a 40 mm de la línea de los incisivos con erosiones hemorrágicas.

Del 13 de agosto de 2006 al 15 de noviembre de 2006, el paciente tomó por vía oral el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 a una dosis de 1080 mg/día de forma continuada, sin recibir ningún otro tratamiento antes ni durante la administración del extracto de proteoglicanos de algas.

El 13 de octubre de 2006, el resultado del TAC mostró un defecto de llenado irregular de 5 cm en la parte inferior del esófago, y la altura de la lesión era de 5 mm.

La eficacia terapéutica se evaluó como enfermedad estabilizada (SD).

Paciente ZSCA, varón, nacido el 17 de julio de 1957, su estado y tratamiento fueron los siguientes:

mediante punción y frotis se le diagnosticó al paciente un carcinoma esofágico de células escamosas, estadio IV, el 15 de mayo de 2006.

El 17 de mayo de 2006, el resultado del TAC mostró un ganglio linfático de 5,5 × 5 cm en la clavícula derecha.

Del 17 de mayo de 2006 al 1 de noviembre de 2006, el paciente tomó por vía oral el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 a una dosis de 1080 mg/día de forma continuada, sin recibir ningún otro tratamiento antes ni durante la administración del extracto de proteoglicanos de algas.

El 1 de noviembre de 2006, el resultado del TAC mostró un ganglio linfático de 2,5 × 2 cm en la clavícula derecha.

La eficacia terapéutica se evaluó como una remisión parcial (PR).

Los datos anteriores demuestran que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento también tiene un efecto terapéutico en los cánceres de esófago.

Ejemplo 7 El extracto de proteoglicanos de algas alivió el dolor asociado al tumor

Ejemplo 7.1 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el dolor provocado por el cáncer de hígado (Ejemplo de referencia)

El dolor es un síntoma clínico común del cáncer de hígado avanzado y afecta gravemente a la calidad de vida de los pacientes. Convencionalmente se utilizaban fármacos analgésicos potentes para controlar el dolor. En este Ejemplo, se eligieron 18 pacientes con carcinoma hepatocelular para estudiar el efecto inhibidor o profiláctico del extracto de proteoglicanos de algas sobre el dolor.

Se trataron dieciocho pacientes con carcinoma hepatocelular con el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.1 a una dosis de 1080 mg/día, hasta que los pacientes murieran o la administración oral resultara irrealizable. Ninguno de los casos tomó otros fármacos analgésicos durante el estudio, y el dolor de los 14 pacientes se midió mediante una escala de dolor. Entre estos 14 casos, 2 casos no mostraron dolor en ningún momento; 7 casos mostraron alivio del dolor; 5 casos mantuvieron un dolor leve de 1-2 grados, sin cambios. Los casos típicos incluían a los siguientes pacientes.

Un paciente necesitaba tomar fuertes analgésicos de morfina al entrar en el estudio, y los analgésicos no fueron necesarios poco después de la administración del extracto de proteoglicanos de algas. Otro paciente tenía un tumor enorme (8 × 8,5 cm) detectado mediante un análisis por imagen, pero no apareció ningún síntoma de dolor en la paciente tras la administración del extracto de proteoglicanos de algas.

Los datos anteriores mostraron que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento tiene un importante efecto para inhibir y aliviar el dolor.

Las escalas de evaluación del dolor utilizadas en el presente documento son las siguientes:

Valoración de la calidad de vida de los pacientes

A. Apetito:

- ①. La ingesta de alimentos es casi imposible;
- ②. Ingesta de alimentos <1/2 de la ingesta normal;
- ③. Ingesta de alimentos = 1/2 de la ingesta normal;
- ④. Ingesta de alimentos ligeramente reducida;
- ⑤. La ingesta de alimentos sigue siendo normal.

C. Dolor:

- ①. Dolor intenso, con posición pasiva, intolerable;
- ②. Dolor intenso;
- ③. Dolor moderado;
- ④. Dolor leve;
- ⑤. Sin dolor.

E. PS (ECOG):

- ①. IV; ②. III; ③. II; ④. I; ⑤. 0.

B. Sueño:

- ①. Dificultad para conciliar el sueño;
- ②. Sueño muy escaso;
- ③. Sueño escaso;
- ④. Sueño algo escaso;
- ⑤. Más o menos normal.

D. Síntomas relacionados con el tumor (excepto el dolor):

- ①. Intenso, intolerable;
- ②. Intenso;
- ③. Moderado;
- ④. Leve;
- ⑤. Ninguno

25

Ejemplo 7.2 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas en el dolor del carcinoma de páncreas

También se estudió el efecto inhibidor del extracto de proteoglicanos de algas sobre el dolor en 24 pacientes con cáncer de páncreas, y los síntomas del dolor. Se trataron 24 pacientes con carcinoma de páncreas inscritos en el estudio con el extracto de proteoglicanos de algas preparado de acuerdo con el Ejemplo 1,1 a una dosis de 2025 mg/día, hasta que los pacientes murieran o la administración oral resultara irrealizable. Los síntomas de dolor se aliviaron significativamente en 24 pacientes, según la escala de evaluación del dolor.

Ejemplo 8 Efecto inhibidor del extracto de proteoglicanos de algas sobre la inflamación

35

La inflamación promotora de tumores se considera una de las características del cáncer. Las enfermedades inflamatorias crónicas pueden aumentar el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, y diversas pruebas epidemiológicas sugieren que los AINE, especialmente el ácido acetilsalicílico, son potentes agentes profilácticos químicos. Existen muchas células inflamatorias diferentes en el microentorno tumoral; y el direccionamiento de estos factores en modelos de ratón de cáncer hereditario, trasplantable e inducible puede reducir significativamente la aparición, el desarrollo y la diseminación de enfermedades tumorales. Por lo tanto, esta compleja red de inflamación proporciona un objetivo para la prevención y el tratamiento de enfermedades malignas. En este Ejemplo se analizó el efecto del extracto de proteoglicanos de algas sobre la expresión de mediadores inflamatorios en células cancerosas.

Ejemplo 8.1 Efecto regulador del extracto de proteoglicanos de algas sobre la expresión de mediadores inflamatorios en el modelo de cáncer de páncreas

De acuerdo con los protocolos descritos en el Ejemplo 1, se preparó el extracto de proteoglicanos de algas y se cultivó la línea celular de carcinoma de páncreas PANC-1.

50

Las células se sembraron en placas de Petri de 100 mm (Corning®) (250 000 células por placa de Petri en 16 ml de medio) el día 1. Las células PANC-1 se trataron con 5 mg/ml de extracto de proteoglicanos de algas o con medio que contenía PBS (control) el día 2. Las células se dividieron en tres grupos: el grupo de control, el grupo de tratamiento de 3 horas y el grupo de tratamiento de 18 horas, estando cada grupo duplicado.

5

Utilizando el sistema SignArrays® de AnyGenes®, se estudió la expresión de factores asociados a seis vías de señalización qPCR (SignArrays® de AnyGenes®), incluidas angiogénesis, inflamación, interferón y sistema inmunitario, citocinas, estrés oxidativo y sistemas HLA. La Tabla 7 indica el número de factores cuya expresión estaba significativamente reprimida (al menos 1 vez o más) en comparación con la muestra de control, entre los 76 mediadores inflamatorios analizados. El factor de cambio de algunos factores ilustrativos que estaban reprimidos en comparación con el control se enumeró en la Tabla 8.

10

Tabla 7

Tiempo de tratamiento	Número de factores con una expresión significativamente reprimida	Número de factores reprimidos 2 veces o más
3 horas	46	12
18 horas	55	13

15

Tabla 8

Nombre de los factores	Símbolos	Factor de cambio (tratamiento de 3 o de 18 horas)
Receptor de histamina H3	HRH3	3,46
peptidasa 3 relacionada con la calicreína	KLK3	3,07
peptidasa 13 relacionada con la calicreína	KLK13	3,07
Factor de crecimiento insulinoide 2	IGF2	3,66
Factor de necrosis tumoral	TNF	2,8
Receptor 2 de leucotrienos B4	LTB4R2	2,62
Ligando 4 de quimiocina (motivo C-C)	CCL4	2,48
Factor 3 estimulante de colonias (granulocito)	CSF3	2,79
Receptor de dopamina 4	DRD4	4,13
Polipéptido del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta	PDGFB	2,49
peptidasa 11 relacionada con la calicreína	KLK11	3,22
peptidasa 15 relacionada con la calicreína	KLK15	1,15
Receptor de leucotrienos B4	LTB4R	2,04
Leucotrieno C4 sintasa	LTC4S	2,38
Ligando 2 de quimiocina (motivo C-C)	CCL2	1,39
Interleucina 6	IL6	1,41
Interleucina 10	IL10	1,46
Receptor 2 del interferón (α)	IFNAR2	1,08
Factor de crecimiento derivado de plaquetas A	PDGFA	1,15
Factor de crecimiento derivado de plaquetas C	PDGFC	1,2
Factor de crecimiento derivado de plaquetas D	PDGFD	1,97
Proteína C-reactiva	PCR	1,93

A partir de los resultados anteriores, puede observarse que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento puede regular la expresión de diferentes mediadores inflamatorios y citocinas en las células de carcinoma de páncreas PANC-1, y tiene un efecto inhibidor significativo sobre la expresión de múltiples factores inflamatorios.

20

Ejemplo 8.2 Efecto regulador del extracto de proteoglicanos de algas sobre la expresión de mediadores inflamatorios en modelos de cáncer de hígado y de pulmón (Ejemplo de referencia)

25 En el presente estudio, se utilizaron las líneas celulares de carcinoma hepatocelular HuH7 y de adenocarcinoma de pulmón A549. Las dos líneas celulares se cultivaron mediante AnyGenes®.

Las células HuH7 se cultivaron en medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS (suero bovino fetal, Gibco® de Life Technologies™), 1 % de L-glutamina (200 mM; Gibco® de Life Technologies™), 1 % de piruvato de sodio (100 mM; Gibco® de Life Technologies™) y 1 % de estreptomycin-penicilina (10 000 U/ml de penicilina y 10 000 µg/ml de estreptomycin; Gibco® de Life Technologies™), y se incubaron a 37 °C bajo un 5 % de CO₂. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión con azul tripano.

30

Las células A549 se cultivaron en medio RPMI suplementado con un 10 % de FBS (suero bovino fetal; Gibco® de Life

Technologies™), 1 % de L-glutamina (200 mM; Gibco® de Life Technologies™), 1 % de piruvato de sodio (100 mM; Gibco® de Life Technologies™), 1 % de estreptomycin-penicilina (10 000 U/ml de penicilina y 10 000 µg/ml de estreptomycin; Gibco® de Life Technologies™), y se incubaron a 37 °C bajo un 5 % de CO₂. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión con azul tripiano.

5

El extracto de proteoglicanos de algas se preparó de acuerdo con el protocolo descrito en El ejemplo 1. La expresión de los factores relevantes se analizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3.1. La Tabla 9 indica el número de mediadores inflamatorios y citocinas analizados en las células A549 y en las células HuH7, así como el número de factores cuya expresión se vio significativamente reprimida (al menos 2 veces o más) en comparación con las muestras de control después de 6 o de 12 horas de tratamiento. La Tabla 10 muestra el factor de cambio de algunos factores ilustrativos que fueron reprimidos en comparación con el control.

10

Tabla 9

	Número de factores ensayados	Número de factores reprimidos 2 veces o más
Célula A549	63	54
Célula HuH7	29	28

15

Tabla 10

Nombre de los factores	Símbolos	Factor de cambio (en células A549)	Factor de cambio (en células HuH7)
peptidasa 11 relacionada con la calicreína	KLK11	11,70	
peptidasa 14 relacionada con la calicreína	KLK14	7,27	
Receptor B2 de la bradicinina	BDKRB2	9,73	
Factor de necrosis tumoral	TNF	18,69	
Miembro 11 de la superfamilia de factor de necrosis tumoral (ligando)	TNFSF11		5,07
Ligando 3 de quimiocina (motivo C-C)	CCL3	8,25	8
Ligando 7 de quimiocina (motivo C-C)	CCL7	11,64	12,51
Ligando 20 de quimiocina (motivo C-C)	CCL20	6,27	4,71
Ligando 2 de quimiocina (motivo C-X-C)	CXCL2		13,77
Polipéptido del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta	PDGFB	2,75	
Receptor 1 del interferón (α , β y Ω)	IFNAR1	5,01	
Interleucina 3	IL3	10,5	
Interleucina 9	IL9		13,88
Interleucina 17B	IL17B		15,21
Interleucina 20	IL20		45,27
Factor 3 de diferenciación del crecimiento	GDF3	36,53	
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (factor inhibidor de la glicosilación)	MIF	5,89	
Factor 2 de diferenciación del crecimiento	GDF2		1172,65
Factor 11 de diferenciación del crecimiento	GDF11		8,42
Proteína morfogenética ósea 2	BMP2	5,67	2,72
Proteína morfogenética ósea 4	BMP4	2,36	6,04
Trombopoyetina	THPO		6,29
peptidasa 4 relacionada con la calicreína	KLK4		4,48
peptidasa 5 relacionada con la calicreína	KLK5		6,92
Factor de crecimiento derivado de plaquetas C	PDGFC	2,83	2,52
Factor de crecimiento derivado de plaquetas D	PDGFD	3,15	
peptidasa 15 relacionada con la calicreína	KLK15	2,32	
Proteína C-reactiva	PCR	25,15	12,15
Receptor B1 de la bradicinina	BDKRB1	2,71	
Interleucina $\alpha 6$	IFNA6	27,34	

Los resultados de los Ejemplos 8.1 y 8.2 muestran que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento parece ser un modulador importante para regular la expresión de mediadores inflamatorios y citocinas en una variedad de modelos de cáncer, y puede inhibir significativamente la expresión de diferentes citocinas proinflamatorias, lo que demuestra que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento es capaz de inhibir la aparición y progresión de la inflamación, en particular la inflamación asociada al tumor.

20

Además, la siguiente Tabla 11 muestra la relación correspondiente entre los factores inflamatorios y las enfermedades mediadas por los factores, de lo que se desprende que los mediadores inflamatorios y las citocinas que son regulados por el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento pueden mediar en el desarrollo de

25

diferentes enfermedades. Por lo tanto, los extractos de proteoglicanos de algas capaces de reprimir estos factores inflamatorios pueden utilizarse para tratar o prevenir diversas enfermedades y trastornos asociados a los factores inflamatorios que incluyen, pero sin limitación, las enfermedades o los trastornos indicados en la Tabla 11.

5

Tabla 11

Nombre de los factores	Enfermedades correspondientes
Receptor de histamina H3 (HRH3)	inflamación crónica de la vejiga, uretritis, vértigo vestibular, anafilaxia, asma, cáncer de hígado, cáncer de colon
peptidasa 3 relacionada con la calicreína (KLK3)	Cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de testículos
peptidasa 11 relacionada con la calicreína (KLK11)	Cáncer de próstata, cáncer gástrico
peptidasa 14 relacionada con la calicreína (KLK14)	cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino,
Factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF2)	Hemangioma (infantil), enfermedad cardiovascular, cáncer colorrectal, meningitis purulenta, cáncer de endometrio, carcinoma hepatocelular humano, cáncer de hígado primario, aborto espontáneo, cáncer de vejiga, esquizofrenia, glioma cerebral, cáncer de hígado, cáncer gástrico, fibrosis hepática, cáncer colorrectal, hemorragia cerebral, cáncer de pulmón no microcítico, hepatitis B, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda
Factor de necrosis tumoral (TNF)	infarto cerebral, hipertrofia de las amígdalas faríngeas, hepatitis C, mieloma múltiple, lupus eritematoso sistémico, inflamación de la artritis reumatoide, neumonía por micoplasma, colitis ulcerosa, asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tuberculosis, Enfermedad de Parkinson, esteatosis hepática no alcohólica, hipertensión por obesidad, artritis idiopática juvenil, rinitis alérgica, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cardiopatía coronaria, hepatitis autoinmunitaria, colangitis esclerosante, cáncer de mama, síndrome de obesidad de peso normal, retinopatía diabética, hepatitis C, psoriasis, cáncer cervicouterino, espondiloartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso, hipersomnia, cáncer de pulmón, enfermedad de Behcet, arteritis de células gigantes
Receptor 2 de leucotrienos B4 (LTB4R2)	Cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, psoriasis vulgar, síndrome del ganglio linfático mucocutáneo, colitis, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad alérgica, inflamación de las vías respiratorias, cáncer de páncreas, leucemia, cáncer de ovario, enfermedad alérgica, asma bronquial, cáncer gástrico, ictus isquémico
Ligando 4 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL4)	daño hepático agudo inducido por fármacos
Factor estimulante de colonias 3 (granulocito) (CSF3)	Leucemia neutrofílica crónica, lupus eritematoso sistémico
Receptor de dopamina 4 (DRD4)	Esquizofrenia
Polipéptido beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB)	Carcinoma papilar tiroideo, asma bronquial, meningioma, diabetes de tipo 2, tromboembolia pulmonar
Receptor B2 de la bradicinina (BDKRB2)	Artrosis, hipertensión, infarto de miocardio, Enfermedad de Parkinson, artrosis, enfermedad de Alzheimer, angioedema hereditario
Miembro 11 de la superfamilia de factor de necrosis tumoral (ligando) (TNFSF11)	Tiroiditis, carcinoma papilar de tiroides
Ligando 3 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL3)	Hepatitis B crónica, tuberculosis, enfermedad ósea del mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, lupus eritematoso sistémico, condrosarcoma
Ligando 7 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL7)	Leucoplasia oral y carcinoma de células escamosas, rinitis alérgica, sinusitis crónica, Infección por <i>Listeria</i> , colitis ulcerosa, miocarditis y esclerosis múltiple, mieloma múltiple, cáncer gástrico, hepatitis B crónica, cáncer de próstata, cáncer de laringe
Ligando 20 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL20)	Nefropatía por IgA, cáncer de hígado, miocarditis vírica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer colorrectal, psoriasis, cáncer gástrico, carcinoma de células escamosas de laringe, dolor lumbocrural discógeno, hepatitis B crónica, lupus eritematoso sistémico, cáncer de pulmón, cáncer de mama, ictus cerebral, cáncer de colon, pulpitis, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma esofágico de células escamosas

(continuación)

Nombre de los factores	Enfermedades correspondientes
Ligando 2 de quimiocinas (motivo C-X-C) (CXCL2)	Cáncer de próstata, cáncer colorrectal, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma papilar tiroideo, tuberculosis
Interleucina 3 (IL3)	Leucemia, cáncer colorrectal, enfermedad de Kawasaki, anemia aplásica, cáncer de hígado
Receptor 1 del interferón (α , β y γ) (IFNAR1)	Hepatitis B crónica, hepatitis C crónica, cáncer gástrico, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, piodermatomiositis
Interleucina 9 (IL9)	Enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide, hepatitis B, espondilitis anquilosante, rinosinusitis nasal crónica con pólipos nasales, linfoma difuso de linfocitos B grandes, dermatitis atópica, cardiopatía pulmonar crónica de gran altitud, lupus eritematoso, artritis, enfermedad reumatoide, asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Interleucina 17B (IL17B)	Carcinoma epidermoide de laringe, mieloma múltiple, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, asma infantil, cáncer de colon, cáncer de páncreas
Interleucina 20 (IL20)	Rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, psoriasis, artritis reumatoide, asma bronquial, liquen plano, angina inestable, síndrome coronario agudo, periodontitis
Factor de diferenciación del crecimiento 3 (GDF3)	Cáncer de próstata, cáncer de mama, teratocarcinoma, carcinoma embrionario
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (factor inhibidor de la glicosilación) (MIF)	Cáncer de ovario, cardiopatía coronaria, aterosclerosis, dermatitis atópica, cáncer de endometrio, infarto cerebral, pancreatitis aguda, carcinoma epidermoide cervicouterino, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, artritis reumatoide, carcinoma epidermoide oral, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de pulmón no microcítico, diabetes, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de vejiga, carcinoma epidermoide esofágico
Proteína morfogenética ósea (BMP)	Glioma cerebral, cáncer de hígado, cáncer colorrectal
Trombopoyetina (THPO)	Infarto cerebral agudo, síndrome de Sjogren primario, anemia aplásica infantil, anemia aplásica, hipertensión, cardiopatía coronaria, parálisis cerebral, encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal, hepatitis B
peptidasa 15 relacionada con la caliceína (KLK15)	Cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de mama, enfermedad celíaca, leucemia infantil
Leucotrieno C4 sintasa (LTC4S)	Ictus isquémico, asma, síndrome de hipopnea apnea obstructiva del sueño, lupus eritematoso, enfermedad cardiovascular
Ligando 2 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL2)	Enfermedad de Parkinson, cáncer de mama, leucemia, cáncer de próstata, daño cerebral hipóxico-isquémico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, gota, amigdalitis, cáncer gástrico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, diabetes de tipo 2, cardiopatía coronaria, trastorno obsesivo compulsivo, artritis reumatoide, artrosis de rodilla, nefropatía crónica, ictus isquémico, esteatosis hepática no alcohólica
Interleucina 6 (IL6)	Enfermedad de insuficiencia cardíaca; infección pulmonar; síndrome metabólico; diabetes de tipo 2; cardiopatía coronaria; esteatosis hepática; septicemia neonatal; fiebre aftosa; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; cáncer de hígado; artritis reumatoide; hepatitis B; ataque isquémico transitorio; cáncer cervicouterino; síndromes coronarios agudos; cáncer de endometrio; cáncer de pulmón; ictus isquémico; cáncer de próstata; lupus eritematoso; carcinoma epidermoide esofágico; esclerosis múltiple; dermatomiositis; carcinoma nasofaríngeo, enfermedad cardiovascular; cáncer de próstata, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso
Interleucina 10 (IL10)	Enfermedad inflamatoria intestinal; artritis reumatoide; psoriasis; cáncer gástrico; cardiopatía coronaria; enfermedad periodontal; enfermedad cardiovascular; asma; diabetes de tipo 1; esquizofrenia; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; septicemia; dermatitis atópica; diabetes de tipo 2; síndrome coronario agudo; hepatitis B; lupus eritematoso; fiebre aftosa; encefalitis; cáncer cervicouterino; eclampsia; tuberculosis
Receptor del interferón (α) 2 (IFNAR2)	Hepatitis C, hepatitis B
Factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGFA)	Colangiocarcinoma hiliar, esclerosis sistémica, cáncer colorrectal, colitis ulcerosa, carcinoma epidermoide cervicouterino, carcinoma nasofaríngeo
Factor de crecimiento derivado de plaquetas C (PDGFC)	Cáncer de mama

Factor de crecimiento derivado de plaquetas D (PDGFD)	Cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cardiopatía coronaria, complicaciones macrovasculares diabéticas, colangiocarcinoma, carcinoma epidermoide esofágico, enfermedad coronaria aterosclerótica, cáncer de ovario, hemorragia cerebral, cáncer de próstata, ictus isquémico
Proteína C-reactiva (PCR)	Neumonía infantil, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cardiopatía coronaria, asma, síndrome de ovario poliquístico, hipertensión, síndrome de hipopnea apnea obstructiva del sueño, septicemia neonatal, depresión, enfermedad de Kawasaki, neumonía extrahospitalaria, nefropatía diabética, artritis reumatoide, diabetes de tipo 2, infarto cerebral, pancreatitis, septicemia, cáncer de colon, esquizofrenia, carcinoma de células renales, infarto de miocardio, aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular, enfermedad isquémica cardio-cerebrovascular, síndrome metabólico
peptidasa 4 relacionada con la calicreína (KLK4)	Cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal
peptidasa 5 relacionada con la calicreína (KLK5)	Cáncer de mama, adenocarcinoma colorrectal, cáncer rectal, cáncer de ovario, Síndrome de Netherton, dermatitis atópica
Receptor de bradicinina B1 (BDKRB1)	Cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de vesícula biliar
Interleucina α6 (IFNA6)	Hepatitis B

Ejemplo 9 Efecto sinérgico del extracto de proteoglicanos de algas junto con antineoplásicos en el tratamiento del cáncer (Ejemplo de referencia)

- 5 Los animales experimentales utilizados en este estudio fueron ratones C57 hembra (18-22 g) o ratones KM hembra (18-22 g), que fueron proporcionados por el Shanghai Experimental Animal Center of the Chinese Academy of Sciences, N.º de certificado: 005.

Los tumores, incluidos el melanoma B-16 y el sarcoma S-180, fueron proporcionados por el Shanghai Institute of
10 Materia Medica of the Chinese Academy of Sciences.

El carboplatino se adquirió en Shandong Qilu Pharmaceutical Factory. La adriamicina se adquirió en Zhejiang Haimen Pharmaceutical Factory. El etopósido se adquirió en Pudong Pharmaceutical Factory de Yadong Pharmaceutical Company del Shanghai Pharmaceutical Industry Research Institute. El 5-fluorouracilo se adquirió en Shanghai Xudong
15 Haipu Pharmaceutical Co., Ltd. La ciclofosfamida se adquirió en Shanghai Hualian Pharmaceutical Co., Ltd. El resto de antineoplásicos se adquirieron en Beijing Kerui Biological Engineering Co., Ltd.

Ejemplo 9.1 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas junto con otros antineoplásicos en el melanoma

20 *Esquema experimental*

Se utilizaron ratones C57 hembra (18-22 g) y melanomas B16 bien desarrollados de 7-11 días. El tejido tumoral se convirtió en suspensión celular. Se inoculó la suspensión celular a los ratones por vía subcutánea en la axila derecha, aproximadamente $4,5-5 \times 10^6$ células/ratón. Después de 24 horas, los ratones se dividieron aleatoriamente en
25 diferentes grupos y se alojaron en jaulas separadas (n = 6). Se administró extracto de proteoglicanos de algas por vía oral y carboplatino, doxorubicina o CTX por vía intraperitoneal, una vez al día. La administración comenzó el segundo día y duró siete días, con diferentes dosis. Al grupo de control de blanco se le administró solución salina normal (NS). Los animales fueron sacrificados y pesados (g de peso corporal) 24 horas después de la retirada del fármaco. Los tumores fueron extirpados y pesados. Se calculó el peso promedio del tumor para cada grupo. De acuerdo con la
30 siguiente fórmula, se calculó la tasa de inhibición tumoral y se realizó la prueba T.

$$\text{Tasa de inhibición tumoral} = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

35 A = peso medio del tumor (g) del grupo de control de blanco,

B = peso medio del tumor (g) del grupo terapéutico

Posología

40 De acuerdo con los resultados de los experimentos preliminares, la dosis del extracto de proteoglicano de algas (en lo sucesivo en el presente documento, proteoglicano de algas) se fijó en 30 mg/kg y 60 mg/kg, las dosis de carboplatino fueron de 4 mg/kg y 8 mg/kg, la dosis de doxorubicina fue de 1 mg/kg, y se administró CTX a 7,5 mg/kg.

Resultados experimentales

Tabla 12 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas (30 mg/kg) combinado con carboplatino en el melanoma

Grupo	Dosis	Vía de administración	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)	Valor de <i>p</i>
			al principio	al final	al principio	al final			
NS	----		20	20	17,8	18,9	1,49 ± 0,50	----	----
Carboplatino	4 mg/kg	i.p.	10	9	18,0	16,7	1,07 ± 0,88	28,2	>0,05
Proteoglicano de algas	30 mg/kg	v.o.	10	10	17,9	17,5	1,30 ± 0,65	12,8	>0,05
Carboplatino + proteoglicano de algas	4 mg + 30 mg/kg	i.p. + v.o.	10	10	17,6	18,1	0,91 ± 0,62	38,9	<0,01

Tabla 13 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas (60 mg/kg) combinado con carboplatino en el melanoma

Grupo	Dosis	Vía de administración	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)		Valor de p
			al principio	al final	al principio	al final		x ± DE		
NS	---	---	20	18	20,5	23,7	1,43 ± 0,51	---	---	---
Carboplatino	4 mg/kg	i.p.	10	9	20,3	23,2	1,23 ± 0,37	14,0	>0,05	
Proteoglicano de algas	60 mg/kg	v.o.	10	10	20,5	22,6	1,00 ± 0,36	30,1	<0,01	
Carboplatino + proteoglicano de algas	4 mg + 60 mg/kg	i.p. + v.o.	10	9	20,5	23,3	0,85 ± 0,50	40,6	<0,01	

Tabla 14 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas combinado con adriamicina en el melanoma

Grupo	Dosis	Via de administración	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)		Valor de p
			al principio	al final	al principio	al final		x ± DE	%	
NS	----		40	40	20,6	26,4		3,37 ± 1,27	----	----
Adriamicina	1 mg/kg	i.p.	10	10	20,8	24,8		1,97 ± 0,84	41,5	<0,01
Proteoglicano de algas	30 mg/kg	v.o.	10	10	20,5	25,4		2,84 ± 0,80	15,7	>0,05
Adriamicina + Proteoglicano de algas	1 mg + 30 mg/kg	i.p. + v.o.	10	10	20,7	23,2		1,53 ± 0,54	54,6	<0,01

Los resultados anteriores muestran que, en comparación con la monoterapia, el efecto antitumoral del proteoglicano de algas combinado con carboplatino o doxorubicina aumentó significativamente, pero la toxicidad no aumentó. La toma del proteoglicano de algas a una dosis de 30 mg/kg, por ejemplo, aunque el proteoglicano de algas (30 mg/kg) no inhibió eficazmente el crecimiento del melanoma por sí solo ($p > 0,05$), puede potenciar significativamente el efecto de otros fármacos antitumorales. Por ejemplo, cuando se utilizó proteoglicano de algas (30 mg/kg) junto con carboplatino, el efecto antitumoral del carboplatino aumentó significativamente (con una tasa de inhibición tumoral del 38,9 %), en comparación con la monoterapia de carboplatino ($p < 0,01$). Cuando se utilizó proteoglicano de algas (30 mg/kg) junto con doxorubicina, la tasa de inhibición tumoral de la doxorubicina aumentó significativamente en un 13,1 %. Cuando se combinó carboplatino con proteoglicano de algas (60 mg/kg), la tasa de inhibición del carboplatino aumentó significativamente en un 26,6 %.

Los resultados anteriores muestran que el extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento puede potenciar el efecto terapéutico de antineoplásicos tales como carboplatino y doxorubicina en el tumor trasplantado de melanoma B16 en ratones, demostrando que el extracto de proteoglicanos de algas y los antineoplásicos utilizados habitualmente tienen un efecto sinérgico en el tratamiento del melanoma.

Ejemplo 9.2 Efecto terapéutico del extracto de proteoglicanos de algas junto con otros antineoplásicos en el sarcoma S-180 en ratones

Esquema experimental

Se utilizaron ratones KM hembra (18-22 g) y melanomas S-180 bien desarrollados de 7-11 días. El tejido tumoral se convirtió en suspensión celular. Se inoculó la suspensión celular a los ratones por vía subcutánea en la axila derecha, aproximadamente $4,5-5 \times 10^6$ células/ratón. Después de 24 horas, los ratones se dividieron aleatoriamente en diferentes grupos y se alojaron en jaulas separadas ($n = 6$). El extracto de proteoglicanos de algas (en lo sucesivo en el presente documento, proteoglicano de algas) se administró por vía oral; y se administraron ciclofosfamida, carboplatino, 5-fluorouracilo y etopósido por vía intraperitoneal, una vez al día. La administración comenzó el segundo día y duró siete días, con diferentes dosis. Al grupo de control de blanco se le administró solución salina normal (NS). Los animales fueron sacrificados y pesados (g de peso corporal) 24 horas después de la retirada del fármaco. Los tumores fueron extirpados y pesados. Se calculó el peso promedio del tumor para cada grupo. De acuerdo con la siguiente fórmula, se calculó la tasa de inhibición tumoral y se realizó la prueba T.

De acuerdo con la siguiente fórmula, se calculó la tasa de inhibición tumoral y se realizó la prueba T.

$$\text{Tasa de inhibición tumoral} = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

A = peso medio del tumor (g) del grupo de control de blanco,

B = peso medio del tumor (g) del grupo terapéutico

Resultados experimentales

Tabla 15 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas combinado con ciclofosfamida en el sarcoma S-180 en ratones

Grupo	Dosis	Vía de administración	Número de animales				Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)	Valor de p
			al principio	al final	al principio	al final	al principio	al final			
NS	---		20	19	22,7	25,5			$1,92 \pm 0,51$	---	---
Ciclofosfamida	7,5 mg/kg	i.p.	10	10	22,8	24,9			$1,11 \pm 0,24$	42,2	<0,01
Proteoglicano de algas	60 mg/kg	v.o.	10	9	23,0	23,4			$1,24 \pm 0,49$	35,4	<0,01
Ciclofosfamida + proteoglicano de algas	7,5 mg + 60 mg/kg	i.p. + v.o.	10	9	22,9	25,4			$0,91 \pm 0,23$	52,6	<0,01

Tabla 16 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas combinado con carboplatino en el sarcoma S-180 en ratones

Grupo	Dosis	Vía de administración	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)	Valor de p
			al principio	al final	al principio	al final			
NS	---		30	30	18,7	30,4	1,82 ± 0,69	---	---
Carboplatino	4 mg/kg	i.p.	10	10	18,6	26,4	1,68 ± 0,53	7,7	>0,05
Proteoglicano de algas	20 mg/kg	v.o.	10	10	18,7	27,8	1,75 ± 0,48	3,8	>0,05
Carboplatino + proteoglicano de algas	4 mg + 20 mg/kg	i.p. + v.o.	10	10	18,8	24,7	1,22 ± 0,54	33,0	<0,05

Tabla 17 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas combinado con etopósido en el sarcoma S-180 en ratones

Grupo	Dosis	Vía de administración	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)	Valor de p
			al principio	al final	al principio	al final			
NS	---		30	30	18,7	30,4	$1,82 \pm 0,69$	---	---
Etopósido	3 mg/kg	i.p.	10	10	18,7	25,7	$1,33 \pm 0,28$	26,9	>0,05
Proteoglicano de algas	20 mg/kg	v.o.	10	10	18,7	27,8	$1,75 \pm 0,48$	3,8	>0,05
Proteoglicano de algas	30 mg/kg	v.o.	10	10	18,6	27,5	$1,44 \pm 0,67$	20,9	>0,05
Etopósido + proteoglicano de algas	3 mg + 20 mg/kg	i.p. + v.o.	10	10	18,7	24,2	$1,21 \pm 0,41$	33,5	<0,05
Etopósido + proteoglicano de algas	3 mg + 30 mg/kg	i.p. + v.o.	10	10	18,6	23,4	$1,17 \pm 0,44$	35,7	<0,01

Cuadro 18 Efecto terapéutico del proteoglicano de algas combinado con 5-fluorouracilo en el sarcoma S-180 en ratones

Grupo	Dosis	Vía de administración	Número de animales				Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)	Valor de p
			al principio	al final	al principio	al final	al principio	al final			
NS			16	16	18,4	25,3					
5-Fluorouracilo	15 mg/kg	i.p.	8	8	18,6	22,9			1,57 ± 0,51		
Proteoglicano de algas	20 mg/kg	v.o.	8	8	18,3	22,4			1,04 ± 0,52	33,8	<0,05
5-Fluorouracilo + proteoglicano de algas	15 mg + 20 mg/kg	i.p. + v.o.	8	8	18,3	21,6			1,56 ± 0,51	0,6	>0,05
									0,51 ± 0,28	67,5	<0,01

A partir de los datos incluidos en las Tablas 15-18, puede observarse que el proteoglicano de algas a una dosis de 20-30 mg/kg no inhibió el crecimiento del sarcoma S-180 ($p>0,05$), y el proteoglicano de algas a una dosis de 60 mg/kg inhibió el crecimiento del sarcoma S-180 con una tasa de inhibición del 35,4 %, demostrando un efecto inhibidor del proteoglicano de algas en el crecimiento del sarcoma de ratón.

5

El carboplatino a una dosis de 4 mg/kg utilizado solo no tuvo ningún efecto inhibidor sobre el crecimiento del tumor trasplantado de sarcoma S-180 en ratones ($p>0,05$). Cuando se utilizó carboplatino a una dosis de 4 mg/kg junto con 20 mg/kg de proteoglicano de algas, la tasa de inhibición fue del 33 %. El proteoglicano de algas a una dosis de 60 mg/kg utilizado junto con 7,5 mg/kg de ciclofosfamida logró una tasa de inhibición del 52,6 % en el crecimiento del sarcoma S-180, un 10 % superior a la tasa de inhibición conseguida utilizando únicamente ciclofosfamida.

10

El efecto inhibidor del crecimiento del tumor trasplantado de sarcoma S-180 en ratones conseguido únicamente con 3 mg/kg de etopósido fue del 26,9 % ($p>0,05$). Cuando se utilizó etopósido con 20 y 30 mg/kg de proteoglicano de algas, la tasa de inhibición aumentó hasta el 33,5 % ($p<0,05$) y el 35,7 % ($p<0,01$), respectivamente.

15

El 5-fluorouracilo utilizado solo a una dosis de 15 mg/kg tuvo un efecto inhibidor moderado sobre el tumor trasplantado de sarcoma S-180 en ratones. Cuando se combinó el 5-fluorouracilo con el proteoglicano de algas, el efecto antitumoral aumentó significativamente, con una tasa de inhibición del 67,5 %, demostrando que la combinación de los dos fármacos había producido un efecto sinérgico.

20

Los datos anteriores mostraron que el uso combinado del extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento y antineoplásicos tales como 5-fluorouracilo, etopósido, carboplatino y ciclofosfamida puede aumentar la eficacia terapéutica de estos antineoplásicos en el sarcoma S-180 en ratones, y el efecto sinérgico del proteoglicano de algas combinado con 5-fluorouracilo es más significativo.

25

Además, los solicitantes también han estudiado el efecto inhibidor del extracto de proteoglicanos de algas utilizado solo y del extracto utilizado junto con gemcitabina sobre el tumor *in vivo* en ratones atímicos con cáncer de páncreas, así como el efecto inhibidor sobre el carcinoma de páncreas en modelos de xenoinjertos tumorales derivados de pacientes (PDX). Los resultados mostraron que el uso combinado del extracto de proteoglicanos de algas divulgado en el presente documento y gemcitabina también tiene un efecto sinérgico en el tratamiento del carcinoma de páncreas.

30

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o una composición que comprende el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de páncreas, donde
5 el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas se obtiene mediante las siguientes etapas:
 - (a) disolver polvo de algas verdeazuladas en un volumen de agua de 5-20 veces y romper la pared celular;
 - (b) calentar la mezcla resultante de la etapa (a) a una temperatura de 60-100 °C, y realizar la separación sólido-líquido tras el enfriamiento;
 - 10 (c) ajustar el pH del líquido resultante de la etapa (b) a menos de 7, y realizar de nuevo la separación sólido-líquido;
y
 - (d) ajustar el líquido resultante de la etapa (c) hasta un pH neutro, concentrando y secando si fuera necesario.
2. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación
15 1, donde el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas y/o el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, preferentemente líquidos orales, cápsulas, polvos, comprimidos, gránulos, píldoras, jarabes o inyecciones.
3. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación
20 1, donde dicho extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o dicha composición se administran por vía oral, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, preferentemente donde dicho extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o dicha composición se administra por vía oral.
4. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de
25 las reivindicaciones 1-3, donde el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas se administra a una dosis de 5-500 mg/kg de peso corporal al día, preferentemente de 20-150 mg/kg de peso corporal al día, y más preferentemente de 30-120 mg/kg de peso corporal al día.
5. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación
30 1, donde el cáncer de páncreas es un cáncer primario o un cáncer metastásico.
6. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación
1, la composición comprende además un inhibidor de la ADN polimerasa.
7. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación
35 6, donde el inhibidor de la ADN polimerasa es gemcitabina.
8. El extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación
40 6, donde el extracto de proteoglicanos de algas verdeazuladas o la composición se administran por vía oral, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

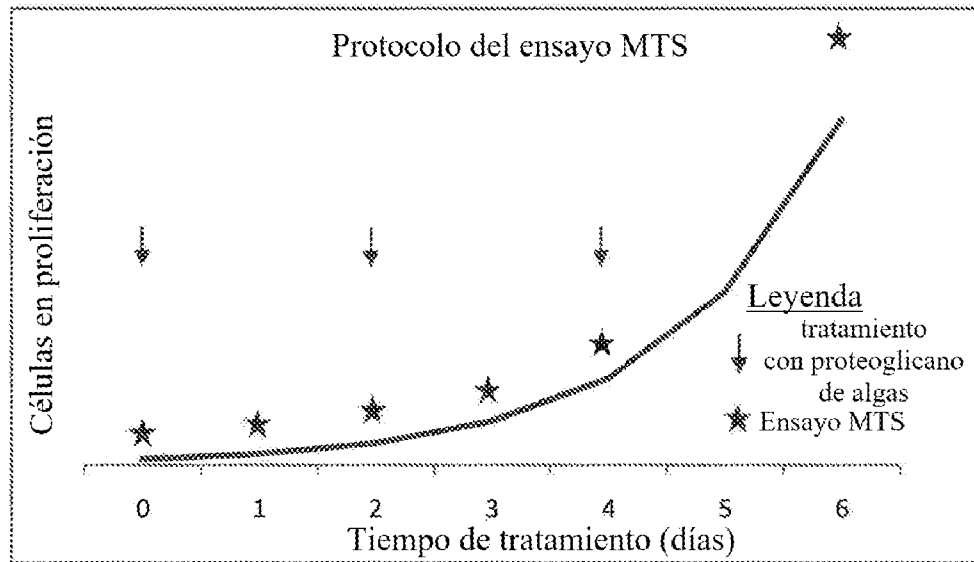


Fig. 1

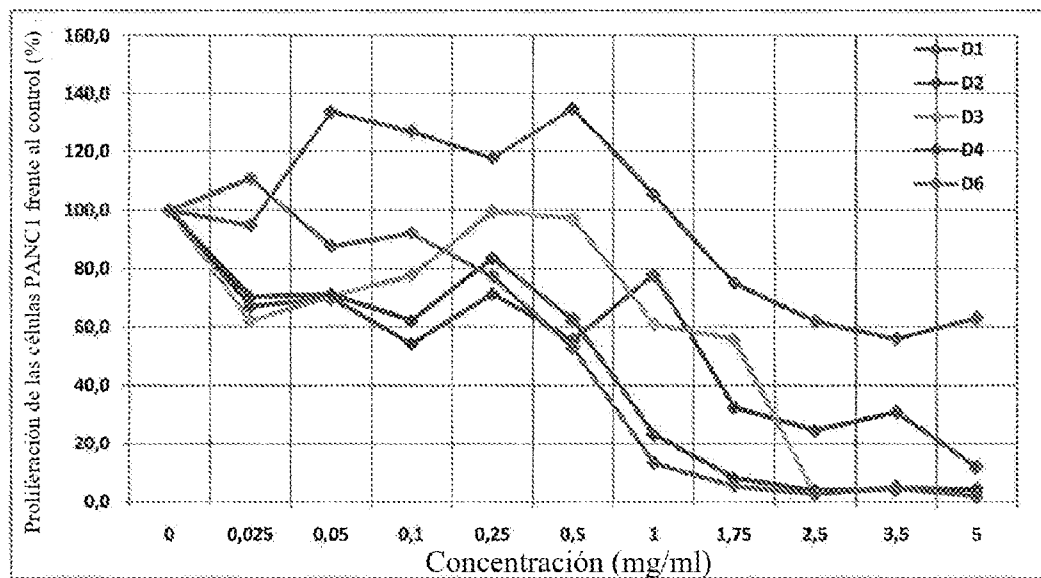


Fig. 2

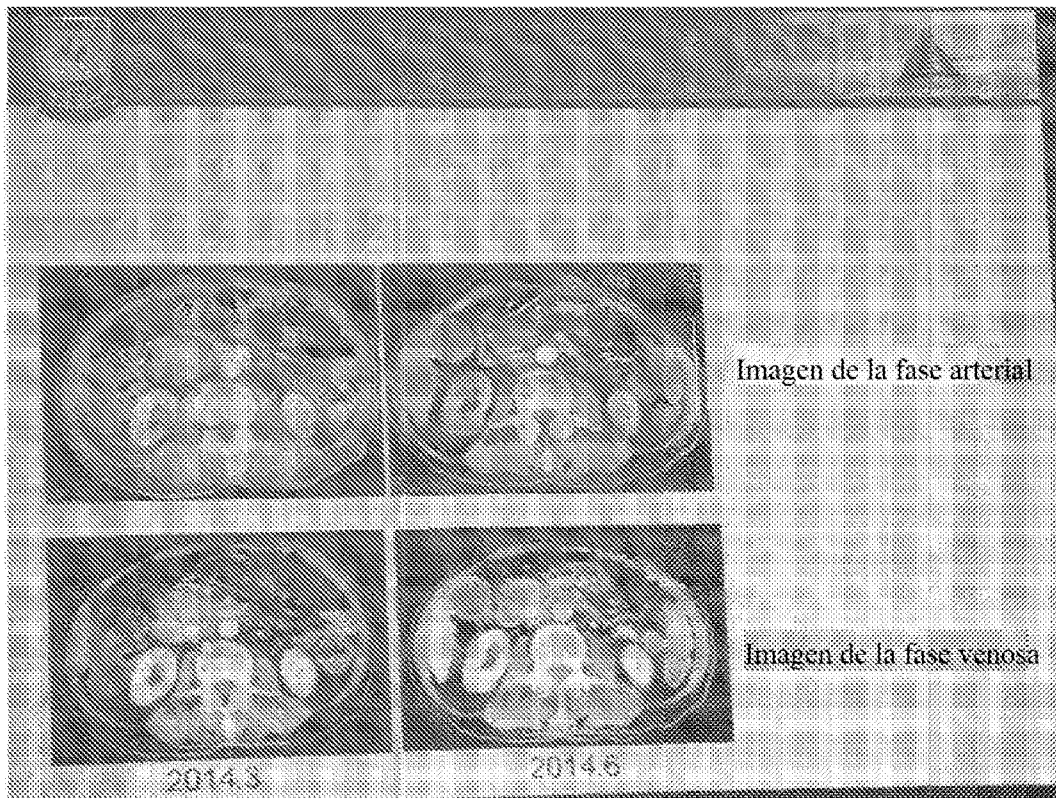


Fig. 3

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- CN 1098707 C [0004] [0014] [0022]
- EP 1197218 A1 [0005]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- RENATA KONÍCKOVÁ et al. Annals of Hepatology, 01 March 2014, 273-283 [0005]