



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 344**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03767380 .3**
96 Fecha de presentación : **22.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1576965**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Combinaciones de factores reguladores del crecimiento y de hormonas para el tratamiento de las neoplasias.**

30 Prioridad: **27.12.2002 CU 338/02**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2010

73 Titular/es: **Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)**
Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán Playa
Ciudad de la Habana 10600, CU

72 Inventor/es: **Bover Fuentes, Eddy;**
Basulto Baker, R.;
Pimentel Vázquez, Eulogio;
Junco Barranco, Jesús;
Fuentes Aguilar, Franklin;
Arteaga More, Niurka;
Calzada Aguilera, Lesvia;
Hernández Domínguez, Héctor;
López Sáez, Yovisleidys;
Guillén Nieto, Gerardo, Enrique y
Chinea Santiago, Glay

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Combinaciones de factores reguladores del crecimiento y de hormonas para el tratamiento de las neoplasias.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere principalmente al campo de la inmunología, la endocrinología y la oncología, y, en particular, a las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y las hormonas sexuales o los implicados en la cascada de liberación de hormonas sexuales o las hormonas de reproducción, que producen una respuesta autoinmunitaria combinada para el tratamiento de las neoplasias.

Técnica anterior

La hormona liberadora de gonadotropina (Ngr.), también conocida como hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), es una hormona peptídica hipotalámica responsable de la liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimuladora de los folículos (FSH) de la adenohipofisis.

Junto con la Ngr. Producida por el sistema hipotalámico existen pruebas de la producción de GnRH en otros lugares del cerebro (Jennes L, Conn P. M. "Gonadotropin-releasing hormona and its receptors in the rat brain". Front Neuroendocrinol. 1994, vol. 15, pág. 51-77), así como en células de la granulosa de ovarios de rata (Peng C., Fan N. C., Ligier M., Vaananen J., Leung P. C. "Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells". Endocrinology 1994, vol. 135, pág. 1740-1746), en células de testículo (Di Matteo L., Vallarino M., Pierantoni R. "Localization of GnRH molecular forms in the brain, pituitary and testes of the frog, *Rana esculenta*". J. Exp. Zool. 1996, vol. 247, pág. 33-40), en placenta humana (Gohar J., Mazor M., Lieberman J. R. "GnRH in pregnancy" Arch. Gynecol. Obstet. 1996, vol. 259, pág. 1-6), en el sistema inmunitario (Jacobson J. D., Crofford L. J., Sun L., Wilder R. L. "Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs". Neuroendocrinology 1998, vol. 67, pág. 117-125) y la hipófisis (Bauer T. W., Moriarty C. M., Childs G. V. "Studies of immunoreactive gonadotropin releasing hormona (GnRH) in the rat anterior pituitary". J. Histochem. Cytochem, 1981, vol. 29, pág. 1171-1178).

La gonadectomía es un procedimiento terapéutico bien conocido necesario para el tratamiento de tumores dependientes de los esteroides gonadales. Los análogos de la GnRH Pueden ejercer su actividad anti-tumoral, no sólo a través de la castración química sino también mediante un efecto directo sobre las células tumorales (Couillard S., Labrie C., Belanger A., Candas B., Pouliot F., Labrie F. "Effect of dehydriepiandrosterone and anti-androgen EM-800 on growth of human ZR-75-1 breast cancer xenografts". J. Nat. Cancer Inst. 1998, May 20, pág. 772-778; Kolle S. y col., "Expression of growth hormone receptor in human prostatic carcinoma and hyperplasia". Int. J. Oncol. 1999, vol. 14, Nº 5, pág. 911-916).

De igual modo, se ha descrito que un antagonista de GnRH (MZ-4-71) puede suprimir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata independientes de andrógenos PC-3, DU-145 y Dunning AT-1 (A. Jungwirth *et al.*, "Inhibition of *in vivo* proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone". British Journal of Cancer 1997, vol. 75, Nº 11, páginas 1585-1592).

La línea celular de Dunning R3327-G se ha usado ampliamente para diferentes estudios generalmente asociados con el tratamiento de tumores prostáticos, así como un procedimiento bien establecido hoy en día. El receptor del EGF se ha encontrado en modelos de próstata sensible a tumores adrogénicos de Dunning R3327 (Damber J. E., Bergh B., Gavfels M. "Epidermal growth factor receptor content in rat prostatic adenocarcinoma: effects of endocrine treatment". Urol. Res. 1995, vol. 23, Nº 2, pág. 119-25). También se ha sugerido que en la sublínea de Dunning R3327-G, la expresión del receptor del EGF está coordinada bajo control androgénico (Coordinate loss of growth factors following castration of rats carrying the Dunning R3327 G prostatic tumor" Clin Physiol Biochem, 1992, vol. 9, Nº 2, pág. 47-50).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 6045 Da, que estimula la proliferación de células epiteliales y mesenquimatosas *in vitro* e *in vivo* (Cohen S., Carpenter G., "Human Epidermal Growth Factor: Isolation and chemical and biological properties" PNAS EE.UU., 1975, vol. 72 pág. 1317). La acción del EGF se ejerce a través de receptores específicos en la membrana celular. El EGF se aisló y purificó por primera vez en partir de glándulas submaxilares murinas (Cohen S. J. Biol. Chem. 1962, vol. 237, Nº 1, pág. 555). Más tarde se obtuvo una molécula similar de la orina humana (Cohen S. "Human Epidermal Growth Factor: Isolation and Chemical and Biological Properties", PNAS EE.UU. 1975, vol. 72, pág. 1317).

La acción bio-reguladora del EGF se ejerce a través de un receptor de membrana (EGF-R), una glicoproteína de aproximadamente 170 kDa, cuyo gen se ha clonado y secuenciado. El dominio intracelular del receptor está asociado con una actividad de proteína tirosina quinasa con una homología estructural con el oncogen v-erb-B que muestra cierta relación con los procesos de transformación maligna (Holding C. H. Cell, 1984, vol. 37, pág. 9-20).

La presencia del EGF-R en las células tumorales avala las predicciones reservadas sobre el cáncer de mama humano. Aproximadamente el 40% de los tumores de mama muestra sitios de unión específica de afinidad elevada por el EGF. (Ríos M. A., y col. "Receptors for Epidermal Growth Factor and Estrogen Predictors of Relapse in Patients with Mammary Carcinoma" *Anticancer Research* 1998, vol. 8, pág. 173-176). También existe una correlación inversa con la presencia de receptores de estrógeno dirigidos al EGF-R, como marcador de diferenciación o indicador de la potencial capacidad de proliferación de las células malignas (Pérez R., Pascual M. R., Macías A., Lage A. *Breast Cancer Research and Treatment* 1984, vol. 4, pág. 189-193).

En estudios previos desarrollados en el modelo de tumor ascítico de Ehrlich en ratones Balb/c (Lombardero J. y col., *Neoplasma* 1987, vol. 33, pág. 4) se probó el efecto inhibitor *in vivo* del EGF, lo que sugiere la posibilidad de considerar esta molécula como transformador de la respuesta biológica.

Se ha desarrollado una composición de vacuna que contiene EGF autólogo acoplado a una proteína transformadora que inhibe el crecimiento tumoral dependiente de EGF con efecto inmunitario, sin efectos colaterales (documento US 5894018: Vaccine composition comprising autologous epidermal growth factor or fragment or derivative, thereof having anti-tumor activity and used thereof in the therapy of malignant diseases).

En estudios previos se ha notificado que el tumor de Dunning expresa niveles elevados de ARNm para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores, en comparación con la próstata ventral ("Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the ventral prostate y Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after concentration", *Prostate* 1998, vol. 36, N° 2, pág. 71-79). Los ensayos en modelos animales han mostrado que la privación de andrógenos puede conducir a regresión vascular y que el VEGF puede regularse con andrógenos. En el cáncer de próstata humano, la producción constitutiva de VEGF en el epitelio glandular se suprimió a causa del tratamiento de ablación de andrógenos. La pérdida de VEGF condujo a la apoptosis selectiva de las células endoteliales en los vasos privados de células periendotheliales (Laura E. y col.: "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal", *J. Clin. Invest.* 1999, vol. 103, N° 2, pág. 159-165).

El VEGF es un mitógeno angiogénico y vasculogénico específico de las células endoteliales y desempeña un papel en la vascularización patológica, que está asociado con un número de patologías clínicas, entre las que se incluyen cáncer y artritis reumatoide. El VEGF es un homodímero glicosilado unido por disulfuro y se expresa en diferentes isoformas (VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 Y VEGF 206) con 121-206 residuos en seres humanos (Yves A. Muller, y col. "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: Multiple copy flexicrystal and receptor binding" *Structure*, 1997, vol. 5, N° 10, pág. 1325-1338).

En términos generales, las células tumorales muestran una dependencia espectacularmente reducida de las señales de crecimiento exógenas y son capaces de generar muchas de sus propias señales. Esta independencia de señal derivada de gran forma, daña el comportamiento homeostático críticamente importante que normalmente funciona para garantizar un comportamiento adecuado de varios tipos de células dentro de un tejido.

Para alcanzar una autonomía de la señal de crecimiento, las células han creado mecanismos que alteran las señales de crecimiento extracelulares, desde traductores transcelulares de estas señales a la acción (Douglas H, y Robert A. W. "The Hallmarks of Cancer (Review)" *Cell* 2000, vol. 100, pág. 57-70). Aunque la mayoría de los factores de crecimiento son producidos por un tipo de célula para estimular la proliferación de otros (proceso de señalización heterotípica), un gran número de células de cáncer tienen la capacidad de sintetizar factores de crecimiento a los que responden creando un vínculo de retroalimentación positiva (estimulación autocrina).

Los receptores de ciertos factores de crecimiento, que normalmente presentan actividad tirosina quinasa en sus dominios citoplasmáticos, se sobreexpresan en muchos tipos de células de cáncer y, como consecuencia, desarrollan una hiperrespuesta a las concentraciones normales de los factores de crecimiento. La sobreexpresión de los receptores de factor de crecimiento también pueden provocar una señalización independiente de ligando. La señalización independiente de ligando puede alcanzarse, también, mediante alteraciones estructurales de los receptores (el receptor del EGF puede perder parte de su dominio citoplasmático y señalizar de forma constitutiva).

La cascada SOS-Ras-Raf-MAPK desempeña el papel fundamental en la señalización debido a la acción de factores de crecimiento. El 25% de los tumores humanos tienen problemas en la regulación de la expresión de la proteína Ras, aunque las vías de señalización del crecimiento están alteradas en todos los tumores humanos (casi la mitad de los carcinomas de colon humanos portan oncogenes ras mutados y se piensa que el resto es defectivo en otros componentes de la vía de señalización).

Las células normales, como los fibroblastos y las células endoteliales, pueden desempeñar un papel fundamental en la proliferación de células tumorales. En un tejido normal, se estimula a las células para que crezcan a través de las señales de sus vecinas (paracrinas), o señales sistémicas (endocrinas). Por tanto, para explicar la proliferación de células tumorales, señalización heterotrófica entre los diversos tipos de células dentro del tumor, se debe considerar tan importante como los mecanismos autónomos mencionados en lo que antecede. En este sentido, el oxígeno y otros nutrientes suministrados por la vasculatura son esenciales para estas funciones, así como para la supervivencia de las células tumorales.

La capacidad para inducir una angiogénesis sostenida parece adquirirse en una pequeña etapa (o etapas) durante el desarrollo tumoral, a través de un "cambio angiogénico" desde la quiescencia vascular. La neovascularización es un requisito previo para la expansión clonal asociada con la formación de tumores macroscópicos.

El efecto mitogénico de los factores de crecimiento en las líneas celulares se puede contrarrestar con análogos del GnRH, que muestra la interacción de la GnRH con la vía mitogénica de transducción de señal. Esta hipótesis se demostró mediante inhibición de la actividad tirosina quinasa, inducida por factores de crecimiento en células tumorales humanas de ovario y endometrio mediante agonistas del GnRH, que parcialmente se debe a la activación de la fosfotirosina quinasa inducida por GnRH.

El tratamiento con análogos de GnRH se ha asociado con una disminución espectacular de los receptores de los factores de crecimiento (EGF, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1)) sobre la membrana de las células tumorales y un brusco incremento en los niveles de ARNm del EGF-R en tumores. Además, Se han notificado actividad anti-proliferativa y cambios en la expresión del receptor de estrógenos y andrógenos en ciertas líneas tumorales.

Los avances en la investigación del cáncer durante más de un cuarto de siglo han favorecido la acumulación de pruebas indudables que avalan la tumorigénesis como proceso dinámico maligno con múltiples fases. El amplio catálogo de genotipos de células malignas es una manifestación de alteraciones esenciales en la fisiología celular. Estas transformaciones dirigen de forma colectiva el crecimiento de tejido maligno en diferentes tipos de tumores.

Por tanto, un importante problema para el tratamiento del cáncer que todavía no se ha resuelto es alcanzar la modulación de la inmunorrespuesta activa o pasiva.

Resumen de la invención

La presente invención es la solución al problema descrito en lo que antecede, usando una nueva combinación farmacéutica que comprende factores reguladores del crecimiento (EGF o VEGF) y hormonas sexuales y/o los implicados en la cascada de la liberación de hormonas sexuales o los implicados en la reproducción (GnRH). Esta combinación es útil para el tratamiento de las neoplasias y, en función de las circunstancias, los ingredientes activos de la combinación se pueden aplicar de forma simultánea, por separado o secuencialmente.

En estudios pre-clínicos, la generación de la respuesta inmunitaria combinada a los factores de crecimiento y las hormonas mencionados en lo que antecede ha permitido mejores resultados que los observados cuando la respuesta inmunitaria a dichos factores y hormonas se genera de forma independiente. Estos resultados proporcionan pruebas de que esta aproximación constituye un modo más eficaz para el tratamiento de los pacientes con neoplasias de diferentes orígenes, ya que se estimula la respuesta anti-tumoral expresada como reducción de la masa tumoral y el incremento del tiempo de supervivencia.

Más particularmente, la presente invención se refiere a combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de neoplasias, para administración simultánea, separada o secuencial, que comprende un compuesto A y un compuesto B; en las que A y B se seleccionan del grupo de moléculas constituidas por:

A:

a.1. GnRH, o sus análogos, o anticuerpos anti-GnRH, o receptor de GnRH (GnRH-R), o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o anticuerpos anti-GnRH acoplados o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación.

a.2 Gonadotropinas naturales o recombinantes, o sus análogos, o variantes mutadas acopladas o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación, anticuerpos anti-gonadotropina, sus Fabs, fragmentos scFv, humanizados o no.

a.3. Receptores de gonadotropina o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, acoplados o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación.

a.4. Anticuerpos anti-receptor de gonadotropina, sus Fabs, fragmentos scFv, humanizados o no.

B.

b.1. EGF natural o recombinante, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados o péptidos miméticos de EGF o análogos de EGF, acoplados o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación.

b.2 Anticuerpos anti-EGF, sus Fabs, fragmentos scFv, humanizados o no.

b.3. Receptor de EGF (EGF-R) o sus variantes mutadas, o péptidos derivados acoplados o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación.

b.4 Anticuerpos anti-receptor de EGF, sus Fabs, fragmentos scFv, humanizados o no.

b.5 VEGF natural o recombinante, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados o péptidos miméticos de VEGF o análogos de VEGF, acoplados o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación.

b.6 Anticuerpos anti-VEGF, sus Fabs, fragmentos scFv, humanizados o no.

b.7. Receptores de VEGF, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados de receptores de VEGF, acoplados o no a una proteína transportadora de inmunopotenciación.

b.8 Anticuerpos anti-receptor de VEGF, sus Fabs, fragmentos scFv, humanizados o no.

En una formulación preferida, las combinaciones farmacéuticas que incluyen moléculas en los grupos A o B se acoplan con la proteína transportadora de inmunopotenciación mediante conjugación, o la formación de proteínas quiméricas. Más particularmente, dentro de las moléculas A, el péptido análogo de GnRH con una secuencia de p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly.

Otra realización de la invención de la proteína transportadora de inmunopotenciación puede ser una de las proteínas de la membrana externa P1 o P64 de Neisseria meningitidis, o un epítipo de células colaboradoras T del toxoide tetánico (TT).

Asimismo, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica en la que la proteína conjugada o quimérica es una de las variantes siguientes:

(b) GnRH unida a una proteína transportadora y a EGF.

(c) GnRH unida a una proteína transportadora y a VEGF.

La presente invención proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria combinada, que comprende tratamiento con las combinaciones terapéuticas definidas en la invención que puede aplicarse de forma simultánea, por separado o secuencialmente.

La presente invención se describe con mayor detalle con los siguientes procedimientos.

Obtención de una preparación inmunogénica que contiene Ngr. Mutada acoplada a un epítipo de células T colaboradoras de toxoide tetánico (D3-1), como uno de los componentes de preparaciones combinadas

Para satisfacer la respuesta de anticuerpos contra GnRH se usa un péptido análogo de GnRH conjugado con una proteína transportadora (vacuna de inmunocastración de mamíferos, documento EPO 959079) para inmunización. El péptido análogo de GnRH (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly) y una proteína transportadora (un epítipo de células T colaboradoras de toxoide tetánico) se sintetizaron químicamente usando dos residuos de glicina como separadores, mediante el procedimiento de fase sólida y estrategia Boc/Bzl, usando "4-metil-benchidrilamina" (MBH A-0,75 mmol/d, BACHEM, Swiss).

La respuesta humoral contra GnRH se puede obtener mediante inmunización activa con GnRH natural o cualquiera de sus análogos acoplados a una proteína transportadora. Además, en las preparaciones combinadas se pueden usar análogos, agonistas o antagonistas de GnRH como tales con un efecto sinérgico en la reducción de la masa tumoral porque interrumpen o paralizan la señalización a través de proteínas G en las células que portan sus receptores. Asimismo, los anticuerpos anti-GnRH se pueden usar como componentes combinados para generar una respuesta inmunitaria pasiva.

Obtención de preparación inmunogénica que contiene factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (hrEGF) acoplado a una proteína transportadora, como un componente de las preparaciones combinadas

Una solución de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (hrEGF) (National Medicament Register Office, Cuba, HEBERMIN, N° 1266) en PBS/MgCl₂ 10 mM se mezcla con una solución de proteína transportadora (P64 recombinante, de la membrana externa de Neisseria meningitidis) en el mismo disolvente; y en una proporción de 1:5 moles de hrEGF por mol de proteína, Más tarde se añade 0,05% de glutaraldehído hasta una concentración final de 0,05 a 0,1%. La mezcla se incuba durante 1-3 horas a temperatura ambiente y se dializa en PBS/MgCl₂ 10 mM, con al menos tres cambios de la solución de diálisis (Composición de vacuna que comprende factor de crecimiento epidérmico autólogo o un fragmento o un derivado del mismo que tiene actividad anti-tumoral y su uso en el tratamiento de enfermedades malignas, documento US 5894018).

La respuesta humoral al EGF también se puede conseguir a través de EGF o su inmunización peptídica de su receptor, acoplado con una proteína transportadora de inmunopotenciación, pasivamente o con administración directa de anticuerpos anti-EGF o receptores anti-EGF.

ES 2 334 344 T3

5 El EGF comparte aproximadamente un 30% de su secuencia con el factor de crecimiento transformante, TGF. Compiten por los mismos sitios de unión de los receptores de membrana. Además, se han comunicado grandes cantidades de complejos del receptor alfa de TGF/EGF en diferentes tipos de tumores humanos. Por tanto, es evidente que la respuesta humoral al TGF es importante en la oncogénesis y que es igualmente importante en la sinergia que se describe para el EGF.

Obtención de preparación inmunogénica que contiene factor de crecimiento de endotelio vascular humano (hVEGF) acoplado a una proteína transportadora, como un componente de las preparaciones combinadas

10 La respuesta humoral al VEGF se consigue mediante inmunización usando el péptido de VEGF conjugado con una proteína transportadora (KLH, hemocianina de lapa californiana) (hVEGF-KLH). La conjugación de la isoforma hVEGF₁₂₁ con la KLH se realizó con acoplamiento de carbodiimida soluble.

15 La respuesta humoral al VEGF también se puede conseguir mediante inmunización con péptidos de VEGF o su receptor, acoplados con cualquier proteína transportadora de inmunopotenciación, pasivamente o mediante administración directa de anti-receptores de VEGF.

Obtención de una preparación inmunogénica combinada de GnRH y hrEGF

20 La preparación inmunogénica combinada se consiguió mediante mezclado de 750 µg de D3-1 y 250 µg de hrEGF-P64 en un volumen final de 0,5 ml.

Obtención de una preparación inmunogénica combinada de GnRH y hVEGF

25 La formulación inmunogénica combinada se consiguió mediante mezclado de 750 µg de D3-1 y 100 µg de hVEGF-KLH en un volumen final de 0,5 ml.

Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra la evaluación del tiempo de supervivencia de ratas Copenhagen a las que se implantó la línea tumoral de Dunning R3327-G sometidas a diferentes tratamientos.

Descripción detallada de formas de realización concretas/Ejemplos

35 La presente invención se ilustra con los ejemplos siguientes.

1. Implante de la línea de células tumorales R3327-G en ratas Copenhagen

40 La línea de células tumorales de Dunning R3327-G se implantó en ratas Copenhagen de 9-12 semanas de edad (con aproximadamente 100 g de peso corporal cada una), que se sometieron a diferentes tratamientos con 2×10^6 densidad celular por animal en medio de implante (RPMI 1640, sin suero en 0,5 ml), en el área laxa de los flancos. Tras 90 días se consiguió un cien por cien de eficiencia de la fijación en los animales.

2. Evaluación del tiempo de supervivencia, como criterio de actividad anti-tumoral para ratas a las que se ha implantado la línea tumoral de Dunning 3327-G bajo diferentes tratamientos

45 Para el experimento se formaron ocho grupos de diez animales cada uno usando ratas de Copenhagen a las que se implantó como se ha descrito en lo que antecede.

Grupos experimentales:

1. Animales placebo (inmunizados con PBS en adyuvante oleoso).
2. Animales castrados quirúrgicamente.
3. Animales tratados con Des (dietilestilbestrol)
4. Animales inmunizados con péptido D3-1 (GnRHm1-TT).
5. Animales inmunizados con hrEGF-P64.
6. Animales inmunizados con hVEGF-KHL.
7. Animales inmunizados con una formulación combinada de D3-1 + hrEGF-P64.
- 65 8. Animales inmunizados con una formulación combinada de D3-1 + hVEGF-KLH.

El esquema de inmunización usado para el tratamiento incluyó 7 dosis (3 dosis antes del implante y 4 dosis después) administradas cada dos semanas: 750 μg de D3-1, 250 μg de hrEGF-P64, 100 μg de hrEGF-KLH y combinaciones de D3-1 + hrEGF-P64 y D3-1 + hVEGF-KLH en un volumen de 0,5 ml en adyuvante oleoso (se usó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y se usó adyuvante incompleto de Freund en la estimulación posterior), por vía subcutánea, en 4 puntos en cada lado de la columna vertebral. En los tratamientos combinados se mantuvo la misma dosis de antígeno que la usada para el tratamiento independiente.

El tratamiento con DES se aplicó y se dejó de aplicar, tres veces a la semana a una velocidad de 1 ml/kg/día, durante toda la duración del experimento y comenzó una vez que se inocularon las células.

La inmunización comenzó 30-45 días antes del procedimiento de implante tumoral y duró hasta completar 7 inmunizaciones; por tanto, la respuesta humoral en el ensayo de ELISA, expresada en forma de títulos de anticuerpos estaba por encima del valor de corte para cada antígeno, antes de la inoculación celular.

La evaluación de los efectos del tratamiento se realizó una vez a la semana durante el periodo experimental (13 meses). El efecto se evaluó como el tiempo de supervivencia del animal en cada grupo experimental. Los datos se muestran en la figura 1.

3. Evaluación de la reducción del tumor como criterio de actividad anti-tumoral en ratas a las que se implantó la línea de células tumorales de Dunning R3327-G bajo diferentes tratamientos

Para el experimento se formaron ocho grupos de diez animales cada uno usando ratas de Copenhagen como se ha descrito en lo que antecede.

Grupos experimentales:

1. Animales placebo (inmunizados con PBS en adyuvante oleoso).
2. Animales castrados quirúrgicamente.
3. Animales tratados con Des (dietilestilbestrol)
4. Animales inmunizados con péptido D3-1 (GnRHm1-TT).
5. Animales inmunizados con hrEGF-P64.
6. Animales inmunizados con hVEGF-KHL.
7. Animales inmunizados con una formulación combinada de D3-1 + hrEGF-P64.
8. Animales inmunizados con una formulación combinada de D3-1 + hVEGF-KLH.

Como el anterior, el esquema de inmunización usado para el tratamiento incluyó 7 dosis (3 dosis antes del implante y 4 dosis después) administradas cada dos semanas: 750 μg de D3-1, 250 μg de hrEGF-P64, 100 μg de hVEGF-KLH y sus combinaciones en 0,5 ml en adyuvante oleoso (se usó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y se usó adyuvante incompleto de Freund en la estimulación posterior), por vía subcutánea, en 4 puntos en cada lado de la columna vertebral.

El tratamiento con DES se aplicó y se dejó de aplicar, tres veces a la semana a una velocidad de 1 ml/kg/día, durante toda la duración del experimento y comenzó una vez que se inocularon las células.

La evaluación del experimento se realizó tras el sacrificio (tres meses después del implante de la línea tumoral). Para evaluar el efecto de cada tratamiento, el tumor se secó y se pesó en una balanza técnica. Como efecto del tratamiento ($E_{\text{tratamiento}}$) se consideró la unidad menos la proporción en peso medio de los tumores en los animales tratados ($P_{\text{tratamiento}}$) y el peso medio del tumor en los animales placebo (P_{placebo}):

$$E_{\text{tratamiento}} = 1 - (P_{\text{tratamiento}} / P_{\text{placebo}}). \quad (1)$$

El efecto previsto ($E_{\text{teórico}}$) en el caso de las formulaciones de combinación doble se puede calcular en el caso de que ningún efecto sea mutuamente excluyente (Caridad W., Guerra Bustillo, Ernesto Menéndez Acuna, Rolando Barrera Morena, Esteban Egana Morales. "Estadística", Editorial Pueblo y Educación, 1989), de acuerdo con:

$$E_{\text{teórico}} = E_{T1} + E_{T2} - (E_{T1} * E_{T2}) \quad (2)$$

en la que E_{T1} es el efecto del tratamiento 1 y E_{T2} es el efecto del tratamiento 2.

ES 2 334 344 T3

Como se muestra en la tabla nº 1, el efecto experimental alcanzado para las combinaciones (preparaciones combinadas) es superior al efecto teórico previsto, lo que prueba el efecto sinérgico de estas combinaciones en la reducción del tamaño del tumor.

TABLA Nº 1

Efecto de diferentes tratamientos en ratas Copenhagen a las que se implantó la línea de células tumorales de Dunning R3327-G en el momento del sacrificio (tres meses después del implante de la línea tumoral)

Tratamiento	Peso del tumor (g) (media de diez animales)	Efecto del tratamiento	Efecto teórico
Castrado	9,20	0,707	-
Placebo	31,41	0,000	-
DES	12,66	0,597	-
D3-1	19,31	0,385	-
hrEGF-P64	25,43	0,190	-
hVEGF-KLH	21,72	0,309	-
D3-1 + hrEGF-P64	12,14	0,613	0,502
D3-1 + hVEGF-KLH	10,87	0,654	0,575

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación farmacéutica para el tratamiento de neoplasias mediante administración simultánea o secuencial, en la que la combinación comprende GnRH, acoplada opcionalmente con una proteína transportadora de inmunopotenciación, y un factor regulador del crecimiento seleccionado de EGF y VEGF, opcionalmente acoplado con una proteína transportadora de inmunopotenciación.
- 10 2. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha GnRH, EGF y/o VEGF están acoplados con una proteína transportadora de inmunopotenciación mediante conjugación o formación de proteínas quiméricas.
- 15 3. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende un péptido análogo de GnRH que tiene la secuencia pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly, acoplado con una proteína transportadora de inmunopotenciación.
- 20 4. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína transportadora de inmunopotenciación se selecciona de las proteínas de membrana externa P1 y P64 de Neisseria meningitidis.
5. Una combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína transportadora de inmunopotenciación es un epítipo de células T colaboradoras del toxoide del tétanos (TT).
- 25 6. Uso de GnRH, opcionalmente acoplada a una proteína transportadora de inmunopotenciación, para preparar una composición farmacéutica para un tratamiento de neoplasias en combinación con un factor regulador del crecimiento seleccionado de EGF y VEGF, opcionalmente acoplado con una proteína transportadora de inmunopotenciación.
- 30 7. Uso de un factor regulador del crecimiento seleccionado de EGF y VEGF, opcionalmente acoplado con una proteína transportadora de inmunopotenciación, para preparar una composición farmacéutica para un tratamiento de neoplasias en combinación con GnRH, opcionalmente acoplada a una proteína transportadora de inmunopotenciación.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho tratamiento comprende la administración simultánea de dicha GnRH y dicho factor regulador del crecimiento.
- 35 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho tratamiento comprende la administración secuencial de dicha GnRH y dicho factor regulador del crecimiento.

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

