



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 308**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4164 (2006.01) **A61K 31/4178** (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01) **A61K 31/404** (2006.01)

A61K 31/4025 (2006.01) **A61K 31/4409** (2006.01)

A61K 31/5375 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03743087 .3**

96 Fecha de presentación : **28.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1491206**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54

Título: **Uso de derivados peptídicos para inducir la diferenciación celular.**

30

Prioridad: **28.02.2002 RU 2002105392**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

73

Titular/es: **OBSHESTVO S OGRANICHENNOI
OTVETSTENNOSTIYU "PHARMENTERPRISES"**
Prospekt Vernadskogo 86, Stroenie 5
Moscow 117571, RU

72

Inventor/es: **Nebolsin, Vladimir Evgenievich;**
Gorbunova, Vera Andreevna;
Treschalin, Ivan Dmitrievich;
Raikhlin, Natan Tanfelevich;
Garin, Avgust Mikhailovich;
Bychkov, Mark Borisovich;
Treschalina, Elena Mikhailovna y
Zheltukhina, Galina Alexandrovna

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 356 308 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

Uso de derivados peptídicos para inducir la diferenciación celular.

5 La invención se refiere a la medicina y en particular, al tratamiento de enfermedades cancerosas y es útil en el tratamiento de tumores de diferentes génesis tal como se especifica en las reivindicaciones.

10 La invención se refiere a la inducción de la diferenciación celular usando derivados peptídicos como agente que induce la diferenciación celular y en particular, a su uso en la terapia no citotóxica antitumoral tal como se especifica en las reivindicaciones.

Se sabe que la ausencia de la capacidad de diferenciar la mayoría de las células tumorales da como resultado un crecimiento tumoral incontrolable.

15 La búsqueda de agentes para inducción tanto específica como no específica de la diferenciación celular es por tanto uno de los enfoques novedosos de la terapia no citotóxica antitumoral.

20 Por "inducción de la diferenciación celular" se entiende la capacidad de las diferentes sustancias para restaurar (o realizar) las siguientes funciones perdidas o disminuidas debido a diversos motivos: pasar un ciclo celular normal por una célula, síntesis de sustancias vitalmente importantes y biológicamente activas en la misma, etc.

25 Las sustancias o compuestos cuyo mecanismo de acción no se asocia con una función celular particular y aquellos pueden provocar su diferenciación por varios parámetros, pueden atribuirse a inductores de diferenciación no específicos.

Se conocen métodos para inducir la diferenciación de células tumorales administrando retinoides o α -2-interferón [Cancer Res., 40, 2245-3350, 1980].

30 Se usa el inductor de diferenciación celular ácido politransretinoico (PTRA) como agente para prolongar la remisión tras la inducción o terapia de posremisión de leucemia promielocítica aguda. La diferenciación celular tal como se afecta por derivados de ácido retinoico conduce a la estabilización del crecimiento de células tumorales [Abelev G.I. Differentiation and tumor phenotype in cells of leukoses and lymphomas/En: The Clinical Oncohematology (editado por M.A. Volkova). Moscú, the Meditsina publishers, 2001, capítulo 11, páginas 116-123].

35 El uso de preparaciones de α -interferón como agentes de inmunoterapia en el tratamiento de melanoma también se asocia con la inducción de la diferenciación de células tumorales en la que se potencia la capacidad de adhesión y se cambia el perfil antigénico. La terapia con interferón da como resultado la progresión reducida del crecimiento tumoral así como previene el desarrollo y la tasa de metástasis [Atzpodien J., Kirchner H. Cancer, Cytokines, and cytotoxic cells: interleukin-2 in the immunotherapy of human neoplasms. Klin. Wochenschr, 1990, v. 68, pág. 1-7].

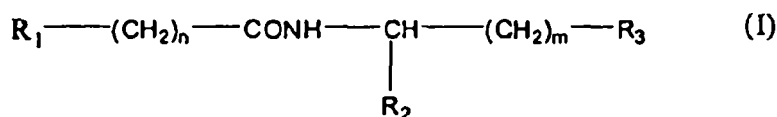
40 Recientemente, se han introducido en la práctica clínica preparaciones que provocan la diferenciación de células hematopoyéticas dañadas debido a quimioterapia citotóxica. Estas preparaciones son diferentes citocinas preparadas a partir de médula ósea tal como hemato hormonas: factor estimulante de colonias granulocíticas, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y otros. Su uso en el tratamiento de diferentes tumores humanos da como resultado la maduración acelerada de las células de la médula ósea y previene el efecto citotóxico hematológico de las preparaciones para quimioterapia [Crawford j., Ozer H., Stoller R. *et al.* Phase II of clinical investigation of GM-CSF by the patients of SCLC with the dose-intensive chemotherapy. The New England Journal of Medicine. 1991, v. 325, N.º 3, pág. 164-170].

50 Por tanto, la inducción de la diferenciación de células tumorales es uno de los mecanismos destacados de la estabilización del crecimiento de neoplasma, aumento del efecto de la inmunoterapia y la corrección de la toxicidad hematológica de las preparaciones para quimioterapia.

55 El documento DE-A-3424781 se refiere al uso de L-carnosina, y sales de la misma, en el tratamiento de tumores. El documento JP-A-1042430 se refiere a L-carnosina en el contexto de aliviar los efectos secundarios de agentes quimioterápicos.

El documento GB-A-2143732 da a conocer una combinación de homocarnosina con OK-432, que se dice que es un inmunopotenciador.

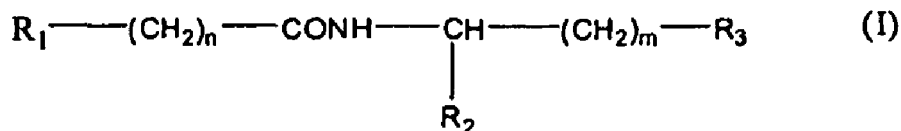
60 Los presentes inventores han descubierto que los derivados peptídicos de fórmula general (I):



ES 2 356 308 T3

son inductores potentes de la diferenciación celular y son útiles como agentes para terapia no citotóxica de enfermedades cancerosas en particular melanoma y hemoblastomas, así como, como agentes de corrección hematológica.

5 Los compuestos de fórmula (I)

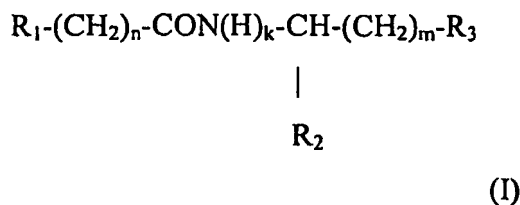


15 se dan a conocer en la solicitud internacional PCT/RU98/00215 como que tienen un efecto antioxidante, antiinflamatorio, antihipóxico, antiinflamatorio, antiviral, antibacteriano, regulador de lípidos, antimetastásico así como otras clases de efectos terapéuticos. Los compuestos de estructura acetil-aspartil-histamina y aspartil-histamina cíclica se dan a conocer en el trabajo de Kvamme, E.; Reichelt, K.L.; Edminson, P.D.; *et al.* N-substituted peptides in brain. Fed. Eur. Biochem. Society Meet., [Proc.], 1975, 41, 127-136.

20

La presente invención proporciona un derivado peptídico de fórmula general (I)

25



30

en la que:

35

- n=0-4, m=1-4, k=0-1;

- R₁ es un radical hidrocarbonado C₁-C₃ sustituido con un grupo funcional seleccionado de grupos carboxílico, amido C₁-C₅ o amino, estando el grupo carboxílico opcionalmente esterificado; o

40

- R₁ es un radical hidrocarbonado C₁-C₃ sustituido simultáneamente con (a) un grupo amino que está opcionalmente sustituido con un sustituyente acilo y (b) un grupo carboxílico; o

45

- R₁ es un radical hidrocarbonado C₁-C₃ sustituido con un grupo heterocíclico insaturado de 5-6 miembros, en el que el radical hidrocarbonado puede comprender simultáneamente un grupo amino opcionalmente sustituido con un sustituyente acilo; o

- R₁ es un grupo heterocíclico saturado;

50

- R₂ es átomo de hidrógeno o un grupo funcional seleccionado de carboxilo, que puede estar esterificado;

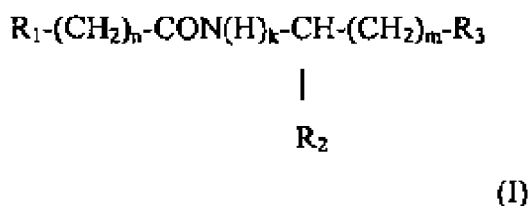
- R₃ es un grupo heterocíclico o cíclico saturado o insaturado de 5-6 miembros, o un grupo carboxilo o amino, estando el grupo carboxilo opcionalmente esterificado;

55

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de hemoblastosis o melanoma.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un derivado peptídico de fórmula general:

60



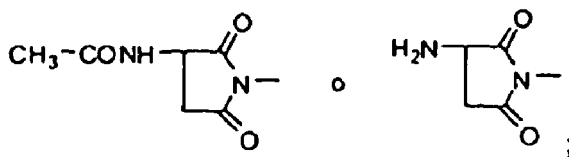
65

ES 2 356 308 T3

en la que:

- n es 0, k es 0 y R₁-CON- es

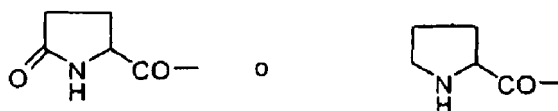
5



10

- n es 0, k es 1 y R₁-CO- es

15

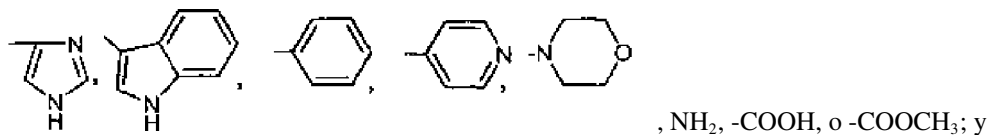


20

- R₂ es H, COOH o COOCH₃;

- R₃ es

25



30

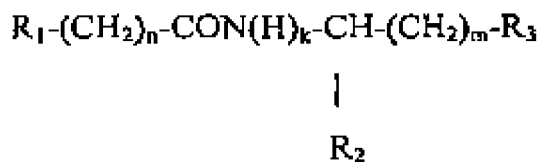
- m es 1-4,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de hemoblastosis o melanoma.

35

También se proporciona un derivado peptídico de fórmula general (I)

40



45

en la que R₁, n, k, R₂, m y R₃ son tal como se definieron anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de neutropenia provocada por terapia mielosupresora.

50

Los compuestos preferidos de fórmula general (I) usados en la presente invención son compuestos de fórmula general (I) mostrados a continuación:

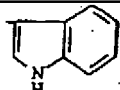
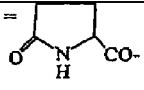
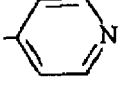
55

Número de compuesto	R ₁	n	k	R ₂	m	R ₃
1	$\begin{array}{c} NH_2-CH- \\ \\ COOH \end{array}$	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im

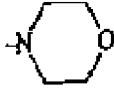
65

ES 2 356 308 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

3	HOOC-CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
4	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ CH ₂ -CH ₂ -COOH	0	1	H	1	-4-Im
6	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
7	HOOC-CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
8	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
9	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
10	NH ₂ -CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
11	NH ₂ -CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
12	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
13	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	$\text{CH}_3\text{-CONH-CH-}$ CH ₂ -COOH	0	1	H	1	-4-Im
15	$\text{R}_1\text{CON-} \equiv \text{CH}_3\text{CONH-CH-}$ CH ₂ -C N-	0	0	H	1	-4-Im
16	$\text{R}_1\text{CON-} = \text{NH}_2\text{-CH-}$ CH ₂ -C N-	0	0	H	1	-4-Im
17	CH ₃ CONH-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
18	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	1	1	H	1	-4-Im
19	CH ₃ OCO-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
20	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)
21	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ CH ₂ -CH ₂ -COOH	0	1	H	1	-3-Ind
22	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-3-Ind
23	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-3-Ind
24	$\text{R}_1\text{CO-} =$ 	0	1	H	1	-3-Ind
25	COOH-CH ₂ -	2	1	H	1	-3-Ind
26	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-3-Ind
27	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	-C ₆ H ₅
28	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	 (-Py)
29	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-Py

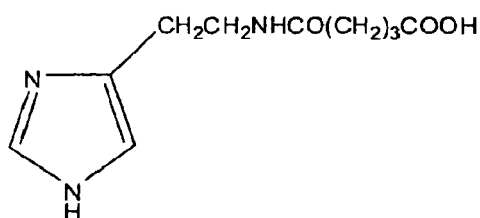
ES 2 356 308 T3

30	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	-Py
31	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	4	-NH ₂
32	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-CH-} \\ \\ \text{CH}_2\text{-4Im} \end{array}$	0	1	H	1	-COOH
33	$\text{R}_1\text{CO-} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{NH} \\ \diagdown \end{array} \text{CO-}$	0	1	H	1	-4-Im
34	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	
35	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{-CH-} \\ \\ \text{CH}_2\text{-4Im} \end{array}$	0	1	H	1	-COOCH ₃
36	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CO-NH-CH-} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	2	1	H	1	-4-Im
37	CH ₃ CONH-CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
38	NH ₂ -CH ₂ -	4	1	H	1	-4-Im

También se proporcionan los compuestos 1 a 9, y 11 a 38 anteriores, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en la reducción de neutropenia provocada por quimioterapia mielosupresora.

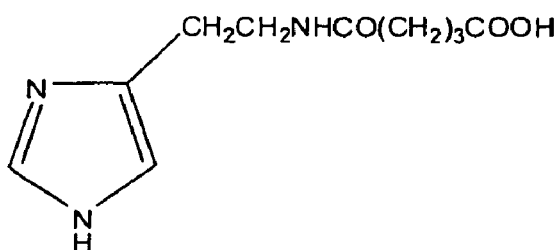
La presente invención también proporciona los compuestos 1 a 7, 9 y 11 a 38 anteriores, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento de hemoblastosis o melanoma, en combinación con interferón, para potenciar la eficacia de la inmunoterapia.

El compuesto más preferido usado en la presente invención es el compuesto de fórmula



(Dicarbamine[®])

En una realización adicional, la presente invención proporciona un derivado peptídico de fórmula



(Dicarbamine[®])

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de neutropenia y trombocitopenia provocada por terapia mielosupresora. También se proporciona dicho derivado peptídico y sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en inmunoterapia contra tumores malignos, en combinación con interferón, para mejorar la eficacia de la inmunoterapia.

ES 2 356 308 T3

En una realización preferida de la invención los derivados peptídicos de fórmula general (I) son para administración durante un período prolongado de tiempo a una dosis única de 0,5-5,0 mg/kg de peso corporal.

5 En una realización preferida de la invención los derivados peptídicos de la invención son para su uso en la inducción de la diferenciación celular en la que con el fin de estabilizar el crecimiento de tumores malignos, en particular melanoma o hemoblastosis, los derivados peptídicos de fórmula general (I) deben administrarse en la dosis única de 0,5-5,0 mg/kg de peso corporal durante al menos 15 días cuando se han agotado las capacidades de la quimioterapia.

10 La administración de derivados peptídicos de fórmula general (I) en combinación con el agente de inmunoterapia interferón da como resultado la potenciación de su eficacia con respecto a células tumorales malignas en particular melanoma.

15 En otra realización preferida de la presente invención, los derivados peptídicos de la presente invención son para su uso en la inducción de la diferenciación celular en la que con el fin de potenciar la eficacia de la inmunoterapia contra melanoma, los derivados peptídicos de fórmula general (I) deben administrarse en una dosis de 0,5-5,0 mg/kg de peso corporal durante no menos de 15 días junto con la administración de interferón.

20 En una realización preferida adicional de la presente invención los derivados peptídicos de la invención son para su uso en la inducción de la diferenciación celular en la que con el fin de disminuir la toxicidad hematológica, los derivados peptídicos de fórmula general (I) deben administrarse diariamente en la dosis única de 0,5-5,0 mg/kg de peso corporal 5 días antes de que se inicie el ciclo de quimioterapia, durante la quimioterapia y dentro del período entre los ciclos de quimioterapia hasta el siguiente ciclo de terapia citotóxica.

25 A continuación, se presentan los ejemplos que ilustran las realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplo 1

30 *Actividad de derivados peptídicos de fórmula general (I) con respecto a la diferenciación de células de melanoma M-6*

35 Se llevó a cabo el estudio en ratones Balb/C hembras (desnudas) sin timo de 10-12 semanas de edad que pesaban 20-22 gramos (criadas en el Centro de Investigación del Cáncer Ruso (RCRC) denominado después N.N. Blokhin de la Academia Rusa de Ciencias Médicas (RAMS)). Se tomó una cepa de melanoma humano obtenido anteriormente a partir de material clínico primario del banco de cepas tumorales del RCRC de la RAMS para su trasplante a ratones "desnudos" sin timo. Se disgregó el tumor mediante solución de Versen con tinción azul tripano vital y se inoculó por vía subcutánea a ratones en la cantidad de 1,6 millones de células por ratón.

40 Se administró Dicarbamine a ratones por vía intragástrica usando una sonda de metal diariamente en una dosis de 1,0 mg/kg empezando 4 días antes de la inoculación del tumor y después durante 10-11 días (ciclo de administración hasta 15 días). Se sacrificaron los ratones con anestesia con éter 12, 24 y 48 horas tras la última administración.

Se usaron 4 grupos de ratones en el experimento:

45 Grupo 1 - el control, no se administra Dicarbamine. Los ratones se sacrifican en los mismos términos que los de los grupos que recibieron Dicarbamine.

Grupo 2 - se administra Dicarbamine y los ratones se sacrifican 12 horas tras la finalización de la administración.

50 Grupo 3 - se administra Dicarbamine y los ratones se sacrifican 24 horas tras la finalización de la administración.

Grupo 4 - se administra Dicarbamine y los ratones se sacrifican 48 horas tras la finalización de su administración.

55 Se determinaron cuatro parámetros morfológicos tales como el número de células con pigmento y el número de células con signos de apoptosis (capacidad para diferenciar), el número de mitosis (actividad de proliferación) y zona de necrosis para monitorizar el grado de diferenciación y proliferación de melanoma M-6 en los grupos de animales control y los grupos de Dicarbamine. Estos parámetros se determinaron dinámicamente y se correlacionaron con la imagen morfológica general de un crecimiento tumoral como signo integral. Para este fin se retiró el tumor en ratones, se colocó en formalina y se procesó histológicamente para microscopía óptica. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 1.

65

ES 2 356 308 T3

TABLA 1

Parámetros morfológicos de melanoma M-6 (microscopía óptica)

Parámetros (en %)		Tiempo transcurrido desde la retirada de Dicarbamine		
		12 horas	24 horas	48 horas
Zona de necrosis	Control	1-2	2-3	3-5
	Tras la administración de Dicarbamine	6-7	7-9	8-10
Mitosis	Control	3-5	3-5	3-5
	Tras la administración de Dicarbamine	3-5	3-5	3-5
Apoptosis	Control	0, 1-0, 2	0, 1-0, 2	0, 1-0, 2
	Tras la administración de Dicarbamine	0, 1-0, 2	0, 2-0, 3	0, 2-0, 3
Células con pigmento	Control	1-2	1-2	2-3
	Tras la administración de Dicarbamine	2-3	2-4	3-5

El estudio llevado a cabo permitió a los inventores establecer que melanoma humano inoculado a ratones desnudos en el día 9 forma el tumor que consiste en células polimorfas que crecen en campos continuos con desarrollo de estroma no significativo. Se cuentan los sitios de necrosis pequeños en el tumor, sitios que aumentan ligeramente a las 48 horas (hasta el 3-5% de zona de corte) en comparación con plazos de sacrificio de 12 y 24 horas (el 1-2% y el 2-3%, respectivamente). Se observó el 3-5% de mitosis en el tumor durante todos los períodos de crecimiento. La apoptosis se expresa ligeramente. Se encuentran con poca frecuencia células que contienen pigmento y su número durante el primer día no supera el 1-2% y sólo en 48 horas de crecimiento aumenta hasta el 2-3%. Por tanto, la intensidad de génesis de melanina durante este período no es significativa. La característica obtenida permite concluir que el melanoma es un tumor de crecimiento rápido que prácticamente carece de capacidad de diferenciar basándose tanto en el grado de apoptosis como ante todo, basándose en la capacidad funcional basal de génesis de melanina.

Se evaluó el efecto de Dicarbamine en la diferenciación de células de melanoma basándose en la intensidad de la génesis de melanina contando el número de células con melanina en los cortes del tumor. Con este objeto, se extirpó el tumor en ratones, se colocó en glutaraldehído y se procesó histológicamente para que se realizara microscopía electrónica. Se calculó el índice de intensidad de génesis de melanina (MGII) que refleja el grado de diferenciación celular en los cortes preparados según la siguiente ecuación:

$$MGII = NCM \times NM,$$

en la que:

NCM es el número de células que contienen melanosomas;

NM es el número promedio de melanosomas por célula.

El análisis de la intensidad de génesis de melanina llevado a cabo mediante este índice se muestra en la tabla 2.

ES 2 356 308 T3

TABLA 2

Intensidad de génesis de melanina comparativa en células de melanoma tras la administración de Dicarbamine (microscopía electrónica)

5

10

15

20

25

30

35

Parámetros (valores absolutos)		Tiempo transcurrido desde la retirada de Dicarbamine		
		12 horas	24 horas	48 horas
Número de células con melanosomas (por 500 células)	Control	135,0	144,0	159,0
	Tras la administración de Dicarbamine	175,0	210,0	227,0
Cantidad promedio de melanosomas por célula	Control	19,0	21,0	26,0
	Tras la administración de Dicarbamine	28,0	35,0	42,0
MGII	Control	5,1	6,0	8,2
	Tras la administración de Dicarbamine	9,8	14,7	19,0

*empezando el día 9 tras la inoculación del tumor

40

La prueba de microscopía electrónica muestra que en comparación con el control, aumentan el número de células tumorales que comprenden melanosomas y el número de melanosomas por célula debido al efecto de Dicarbamine. El índice MGII aumenta para los plazos observados como sigue: en 12 horas - 1,9 veces, en 24 horas - 2,4 veces y en 48 horas - 2,3 veces.

45

Por tanto, tras un ciclo de administración de 15 días de Dicarbamine, el aumento promedio del grado de diferenciación de células tumorales de melanoma M-6 es 2,2 veces lo que está respaldado por la intensidad de génesis de melanina (el índice MGII), el aumento en el número de células que comprenden melanosomas (1,3 veces) y el aumento en el número de melanosomas (1,3 veces).

50

Ejemplo 2

El efecto de Dicarbamine sobre la función de síntesis de melanina de células de melanoma humano inoculadas

55

A ratones con melanoma humano inoculado por vía subcutánea tal como se describe en el ejemplo 1, se les dosificó diariamente por vía p.o. Dicarbamine a una dosis única superior de 4,5 mg/kg durante 3 semanas desde el momento del trasplante tumoral.

60

Se sacrificaron los animales a las 3 semanas del trasplante tumoral. En el momento del sacrificio el volumen del tumor era en promedio de 150 mm³. Tras el sacrificio, el tumor se extirpó en ratones y se disgregó con solución de Versen y se aisló la fracción celular en la que se calculó el número de células con pigmento en la cámara de Goryaev durante la microscopía óptica.

65

Los estudios llevados a cabo muestran que en el control el número promedio de células con melanina era de 39,14±8,72, y en la prueba era de 108,42±11,91, es decir el número de células que sintetizan melanina aumentó significativamente 3 veces (p<0,01).

ES 2 356 308 T3

Por tanto, en las series de pruebas llevadas a cabo usando Dicarbamine a las diferentes dosis, se obtuvo un efecto estadísticamente significativo de inducción pronunciada de diferenciación de células de melanoma humano tal como se evidencia basándose en la intensidad de génesis de melanina.

5 Los datos se presentan en la tabla 3.

TABLA 3

Intensidad de génesis de melanina en células de melanoma humano inducidas por Dicarbamine

10

Número de tumor	Control	Número de tumor	Prueba
	Número de células con melanina		Número de células con melanina
1	32	1	95
2	35	2	111
3	29	3	95
4	42	4	110
5	46	5	130
6	36	6	106
7	54	7	111
Promedio	39,14	Promedio	108,42*
Desviación estándar	8,72	Desviación estándar	11,91

25

30

35

40

*p<0,01

Ejemplo 3

45 *El efecto de Dicarbamine sobre la dinámica de crecimiento de melanoma Mel-6 humano inoculado*

Se llevó a cabo el estudio en ratones Balb/C hembras “desnudas” sin timo de 10-12 semanas de edad que pesaban 20-22 gramos (criados en el RCRC denominado después N.N. Blokhin de la RAMS). Se tomó una cepa Mel-6 de melanoma humano obtenida anteriormente de material clínico primario del banco de cepas tumorales del RCRC de la RAMS para su trasplante a ratones sin timo.

50

Se administró Dicarbamine diariamente por vía p.o. a las dosis únicas de 1,5 mg/kg y 4,5 mg/kg a dos grupos de ratones durante 3 semanas desde el momento del desarrollo tumoral (desde el día 15 hasta el día 36 a partir del trasplante del tumor).

55

Se realizó la medición del tumor en los días 18, 25, 33, 39, 46 y 53 a partir del trasplante. Se evaluó el efecto de Dicarbamine basándose en la dinámica de crecimiento tumoral durante 8 semanas en mediciones múltiples de volúmenes tumorales “V” según la fórmula:

60

$$V = \pi * L * s * h(mm^3)$$

65

en la que L es la longitud en mm, s es el ancho en mm; y h es la altura en mm.

ES 2 356 308 T3

Se calculó entonces la razón entre los volúmenes de los tumores V_t/V_{t-1} expresada en porcentaje y se procesó estadísticamente según el método de Student para calcular una diferencia estadísticamente significativa. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.

5 Los datos obtenidos mostraron un retraso de 7 días en la ganancia de masa tumoral máxima en comparación con el control. En comparación con el grupo control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de crecimiento tumoral en el día 25 desde el trasplante en el grupo de ratones que recibieron Dicarbamine en las dosis únicas de 4,5 mg/kg que corresponde a un ciclo de 10 días de dosificación de Dicarbamine a una dosis de ciclo de 45 mg/kg. En este grupo el volumen del tumor promedio aumentó en el 166,0±93,0%, mientras que en el control este parámetro era del 329,0±88,9% ($p < 0,015$).

Ejemplo 4

15 *El efecto de Dicarbamine en combinación con la quimioterapia sobre el crecimiento de melanoma M-6 humano inoculado trasplantado a ratones sin timo*

Se llevó a cabo el estudio según la técnica descrita en el ejemplo 3. Se administró Dicarbamine diariamente por vía p.o. a la dosis única de 4,5 mg/kg durante 3 semanas desde el momento de la aparición del tumor (desde el día 15 hasta el día 36). En los grupos de tratamiento combinado también se administró Dicarbamine diariamente a la dosis única de 4,5 mg/kg durante 3 semanas (días 15-36) en combinación con una administración única de los agentes citostáticos antitumorales cisplatino a una dosis de 6 mg/kg por vía i.v. (día 25) y aranoza a una dosis de 40 mg/kg por vía i.p. (día 27). Se inició la terapia citostática siendo el volumen del tumor promedio de 200±62 mm³. A los días 18, 25, 33, 39, 46 y 53 del trasplante se midieron los volúmenes de los tumores y se calculó el valor V_t/V_{t-1} , valor que se expresó en porcentaje. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5.

TABLA 5

30 *El efecto de combinar la quimioterapia con agentes citostáticos antitumorales y Dicarbamine sobre las dinámicas de crecimiento de melanoma M-6 humano*

Grupo de ratones	Esquema de terapia		M±m (%) a días tras la inoculación del tumor				
	Dosis(mg/kg) única/ciclo	Días de dosificación	Día 25	Día 33	Día 39	Día 46	Día 53
Control	Solución salina fisiológica por vía p.o.	15-36	329,0 +88,9	132,9 +57,3	21,9 +12,6	10,5 +8,1	3,8 +10,3
Cisplatino Aranoza	6 mg/kg por vía i.v.	25	413,0	177,0	62,04	21,2	18,2
	40 mg/kg por vía i.p.	27	+276,0	+46,0	+30,1	+18,7	+12,7
Dicarbamine	4,5/94,5 mg/kg por vía p.o.	15-36	166,0 +93,0**	276,0 +104,0	39,8 +27,3	19,6 +17,5	4,2 +22,5
Dicarbamine Cisplatino Aranoza	4,5/94,5 mg/kg por vía p.o*	15-36	182,0	191,0	24,5	28,7	8,0
	6 mg/kg por vía i.v.	25	+60,0**	+71,0	+17,4	+9,8	+30,6
	40 mg/kg por vía i.p.	27					

* - diariamente; ** - $p < 0,05$

ES 2 356 308 T3

Se deduce de los datos presentados que Dicarbamine en la vía de dosificación usada retarda el crecimiento tumoral en etapas iniciales lo que puede mostrarse por la disminución en la ganancia de masa tumoral en el día 25 del 166,0±93,0% en comparación con el control en el que la ganancia era del 329,0±88,9%. Por tanto, se reprodujeron los resultados del efecto de Dicarbamine sobre el crecimiento del melanoma (véase el ejemplo 3). La combinación de la quimioterapia con aranoza y cisplatino en los regímenes indicados parecen ser ineficaces, es decir la ganancia del tumor en este plazo era superior al valor control (413,0±276,0%). Esto prueba la ausencia de sensibilidad de la cepa de melanoma humano Mel-6 usada al esquema de quimioterapia proporcionado. La introducción de Dicarbamine en el esquema de quimioterapia ineficaz dio como resultado una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la ganancia de masa tumoral en el día 25 del 182,0±60,0% lo que prueba su eficacia en caso de ausencia del efecto de la quimioterapia.

Ejemplo 5

El efecto de derivados peptídicos de fórmula general (I) sobre la capacidad de proliferación de células de melanoma cuando se administra interferón

Se estudió el efecto de Dicarbamine sobre la capacidad de proliferación de células de melanoma junto con la administración de α -interferón (Introne®, IN). Debe observarse que Dicarbamine por sí misma puede ralentizar la actividad de proliferación de células de melanoma sin cambiar su supervivencia.

Se llevó a cabo el estudio en dos cultivos celulares continuos que crecen en forma de una monocapa en un cultivo tisular sobre células de melanoma B-16 murino y células de melanoma M-5 humano. Se administró IN a concentraciones de 70-700 UI/ml. Se transfirió Dicarbamine (D) a la disolución madre (1.000 μ M), se esterilizó a través de filtros con diámetro de poro de 0,22 μ m y después se diluyó hasta concentraciones de 0,01 y 1,0 μ M.

Se evaluó el efecto de preparaciones sobre células basándose en la tasa inicial de proliferación celular (IRCP). Este índice (IRCP) que habitualmente se denomina tasa de crecimiento de colonias, se determinó contando el número de células en microcolonias durante los primeros días tras la afección en placas de "prueba" (con preparaciones) y "control" (sin preparaciones), analizando 50 colonias en cada una de ellas. Cada "punto" incluía no menos de tres placas Petri con colonias celulares en crecimiento en concentraciones específicas de adición de preparaciones en estudio. Se calculó la tasa de crecimiento de colonias (en %) según la fórmula:

$$\frac{\text{Número de células/colonia (valor promedio) en las placas de prueba} - 1}{\text{Número de células/colonia en las placas control} - 1} \times 100 \%$$

Se calcularon los números de células en microcolonias para cada "punto". Se evaluó la toxicidad de las preparaciones en el intervalo seleccionado de concentraciones mediante la supervivencia de células que se determinó por la razón entre los números de colonias en crecimiento en placas de "prueba" y "control". Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla 6.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 356 308 T3

TABLA 6

El efecto de Dicarbamine y α -interferón sobre la actividad de proliferación de células de melanoma B-16 murino y de melanoma M-5 humano

Preparación	Concentración de IN en UI/ml	Tasa inicial de proliferación celular (% de células/colonia en relación con el control) a un plazo tras entrar en contacto con preparaciones								
		48 horas			72 horas			96 horas		
		Sin D	D, 0,01 μ M	D, 1,0 μ M	Sin D	D, 0,01 μ M	D, 1,0 μ M	Sin D	D, 0,01 μ M	D, 1,0 μ M
Control de M-5		100,0	84,2	69,0	100,0	73,6	50,0	100,0	70,2	49,1
IN	7,0	111,3	79,1	54,7	94,8	49,1	36,9	73,0	46,9	33,3
	70,0	53,7	40,5	30,7	51,9	34,9	24,5	48,8	31,7	23,9
Control de B-16		100,0	52,9	44,6	100,0	61,0	43,6	-	-	-
IN	70,0	-	-	-	50,2	-	26,1	-	-	-
	700,0	38,0	24,9	21,5	29,8	22,0	16,0			

Puede observarse en la tabla que en el control con melanoma M-5 el índice IRCP se conservó al nivel del 100% durante 96 horas.

En las muestras con células de M-5 cuando se añadió α -interferón a la concentración de 7,0 UI/ml en 48 horas, el índice IRCP aumentó hasta el 111,3% y se ralentizó hasta el 94,8 y el 73,0% respectivamente sólo en 76 y 96 horas. Cuando se añadió α -interferón a una concentración de 70 UI/ml en 48 horas, el índice IRCP se ralentizó hasta el 53,7%, en 72 horas - hasta el 51,9% y en 96 horas - hasta el 48,8%. Es decir el efecto de inhibición máximo de α -interferón a una concentración de 70 UI/ml logra un IRCP del 50%.

Cuando se añadió Dicarbamine a la concentración de 0,01 μ M, el índice IRCP en 48 horas se ralentizó hasta el 82,4%, en 72 horas - hasta el 73,6% y en 96 horas - hasta el 70,2% y cuando se añadió Dicarbamine a la concentración de 1 μ M, el índice IRCP en 48 horas se ralentizó hasta el 69,0% y en 72 horas - hasta el 50,0%.

Por tanto, el efecto de inhibición máximo de Dicarbamine también logra el 50% del índice IRCP y se obtuvo a la concentración de preparación de 1,0 μ M.

En las pruebas sobre melanoma B-16 cuando se añadió α -interferón a la concentración de 70 UI/ml, el índice IRCP en 72 horas se ralentizó hasta el 50,0%, y cuando se añadió Dicarbamine en dos concentraciones indicadas, el índice IRCP en 48 horas se ralentizó hasta el 52,9 y el 44,6% respectivamente y en 72 horas hasta el 61,0 y el 44,6% respectivamente. La reducción significativa del índice IRCP hasta el 38,0 y el 29,8% se obtuvo sólo cuando se añadió α -interferón a una concentración de 700 UI/ml.

Por tanto, las pruebas llevadas a cabo muestran que α -interferón y Dicarbamine inhiben el crecimiento de células de melanoma M-5 y melanoma B-16 al nivel del 40,0-50,0% que es característico de inductores de diferenciación. Puede obtenerse un efecto más pronunciado sobre el índice IRCP sólo en caso de un aumento de 100 veces en la concentración de α -interferón.

La adición combinada de α -interferón a una concentración de 70,0 UI/ml y Dicarbamine a células de M-5 muestra que en todos los casos el índice IRCP bajó hasta el 30,7-24,0-31,0% respectivamente para los plazos de registro. El efecto más pronunciado se obtuvo sobre melanoma B-16 cuando se usaron en combinación α -interferón a una concentración de 700 UI/ml y Dicarbamine a ambas concentraciones: el índice IRCP bajó hasta el 24,9 y el 29,8% en 48 horas y hasta el 22,0 y el 16,0% en 72 horas, respectivamente.

Por tanto, Dicarbamine de manera similar a α -interferón ralentiza la proliferación de células de melanoma B-16 murino y melanoma M-5 humano y no muestra toxicidad (según el índice de supervivencia). Tal como se mostró mediante los ejemplos proporcionados, el efecto de Dicarbamine es característico de inductores de diferenciación y tiene un carácter aditivo en combinación con el inductor de diferenciación conocido α -interferón sobre células de melanoma. Este efecto da como resultado la potenciación de la inhibición del crecimiento tumoral y es una indicación para elevar la eficacia de la inmunoterapia de melanomas.

ES 2 356 308 T3

5.2. El efecto de derivados peptídicos sobre la capacidad de proliferación de células de melanoma

5 Se llevó a cabo el estudio en un cultivo celular continuo de melanoma B-16 murino que crece en forma de una monocapa en un cultivo tisular. Se administró α -interferón seleccionado como una preparación de comparación, a una concentración de 70 UI/ml.

Se transfirieron los compuestos sometidos a prueba a una disolución madre (1.000 μ M), se esterilizaron a través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 μ m y después se diluyeron hasta una concentración de 100 μ M.

10 Se evaluó el efecto de los compuestos sobre células basándose en la tasa inicial de proliferación celular (IRCP). Se determinó este índice contando el número de células en microcolonias durante los primeros días tras la afección en placas de “prueba” (con preparaciones) y “control” (sin preparaciones), analizando 50 colonias en cada una de ellas.

15 Se calculó la tasa de crecimiento de colonias (en %) según la fórmula:

$$\frac{\text{Número de células/colonia (valor promedio) en las placas de prueba} - 1}{\text{Número de células/colonia en las placas control} - 1} \times 100\%$$

20 Se realizaron cálculos de números celulares en microcolonias para cada “punto”. Se evaluó la toxicidad mediante la supervivencia de las células de melanoma B-16 que se determinó mediante la razón entre los números de las colonias en crecimiento en placas de “prueba” y “control”. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 7.

25

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 356 308 T3

TABLA 7

El efecto de derivados peptídicos a una concentración de 100 μ M y α -interferón a una concentración de 70 UI/ml sobre la actividad proliferativa de células de melanoma B-16 murino

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Compuesto	Tasa inicial de proliferación celular (% de células/colonia en relación con el control) a un plazo tras entrar en contacto con preparaciones	
	48 horas	72 horas
control	2,52=100%	3,49=100%
interferón	29,6 \pm 2,3	27,4 \pm 2,1
dicarbamine	30,8 \pm 2,8	28,2 \pm 2,2
1	26,6 \pm 2,7	26,6 \pm 2,8
2	25,5 \pm 1,9	25,5 \pm 1,7
3	35,6 \pm 2,9	35,6 \pm 2,9
4	38,3 \pm 3,5	38,3 \pm 3,5
5	32,4 \pm 2,6	32,4 \pm 2,3
6	29,3 \pm 2,4	29,3 \pm 2,2
7	38,8 \pm 2,7	38,8 \pm 2,8
8	21,4 \pm 1,5	16,9 \pm 0,9
9	27,1 \pm 1,7	17,2 \pm 1,3
10	35,9 \pm 3,6	23,1 \pm 1,6
11	21,5 \pm 1,9	20,7 \pm 1,8
12	28,7 \pm 2,1	20,3 \pm 1,9
13	44,9 \pm 4,0	18,9 \pm 1,4
14	33,8 \pm 3,5	19,9 \pm 1,8
15	39,7 \pm 2,5	29,8 \pm 2,3
16	41,3 \pm 4,0	28,9 \pm 2,5
17	39,7 \pm 2,1	26,6 \pm 2,1
18	42 \pm 3	39 \pm 3
19	21 \pm 1	41 \pm 5
20	44 \pm 3	42 \pm 4
21	42 \pm 4	28 \pm 2

Las diferencias con el control son significativas ($p < 0,01$).

55

Los datos presentados en la tabla 7 muestran que los derivados peptídicos inhiben el crecimiento de colonias celulares de melanoma B-16 al nivel del 50,0-70,0% que es característico de inductores de diferenciación.

Ejemplo 6

60

Distribución de células tumorales por fases de ciclo celular a diferentes plazos tras la administración de Dicarbamine

65

Se realizaron pruebas en melanoma B-16 inoculado. El efecto de Dicarbamine sobre la distribución de células tumorales se estudió basándose en el contenido de ADN a diferentes plazos tras la administración de la preparación. Desde el día 6 tras la inoculación del tumor se administraron a los ratones durante 10 días diariamente por vía intragástrica 0,5 mg/kg de Dicarbamine. Se sacrificaron los animales con investigación posterior de material tumoral en los días 10, 12, 16 y 18 tras la inoculación, es decir los días 5 y 7 respectivamente tras la administración de Dicarbamine así como en los días 2 y 4 tras la finalización de la dosificación de 10 días de Dicarbamine.

ES 2 356 308 T3

Los resultados de las pruebas muestran que Dicarbamine provocó un aumento significativo de la parte de células tumorales en interfase (IG¹) ($\approx 25\%$). En una parte constante de células proliferativas ($\approx 30\%$) se observó un aumento en la parte de células IG² (12-14%). Por consiguiente la parte de células del estroma normales (IG¹) en las muestras disminuye de manera compensatoria. Dichos cambios son más claramente pronunciados tras 5-10 administraciones de Dicarbamine.

La dosificación de ciclo de Dicarbamine provoca la redistribución cinética de la población de células tumorales. Se observa la inhibición de células en la fase de ciclo sintético (fase S) con disminución compensatoria en la parte de células que están listas para proliferación o células proliferativas (fase G²). Simultáneamente se produce la acumulación de células tumorales en la fase estacionaria G¹.

Reduciendo el nivel de actividad proliferativa, Dicarbamine promueve la acumulación de células en fase de ciclo celular estacionaria (no proliferativa). Puede ralentizar el crecimiento tumoral y promover la transición de células a un estado más diferenciado.

Ejemplo 7

Eficacia de Dicarbamine con respecto a toxicidad hematológica de ciclofosfamida y sus combinaciones con cisplatino y carboplatino

Se estudió el efecto de corrección hematológica de Dicarbamine sobre la primera generación de híbridos de ratones macho F₁ (CBA x C₅₇BI).

7.1. Se usaron 4 grupos de animales para estudiar el efecto de Dicarbamine sobre la hematotoxicidad de ciclofosfamida (CPH)

Grupo 1 - Dicarbamine, 0,5 mg/kg diariamente empezando 5 días antes de la administración de CPH y durante 5 días tras la administración única de CPH a una dosis de 200 mg/kg;

Grupo 2 - la administración única de 200 mg/kg de CPH;

Grupo 3 - control intacto;

Grupo 4 - Dicarbamine 0,5 mg/kg diariamente durante 10 días.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 8.

TABLA 8

Número total de leucocitos en sangre periférica de ratones bajo el efecto de ciclofosfamida y ciclofosfamida con Dicarbamine

Grupo	Número total de leucocitos (en miles en mm ³) a días tras la dosificación de ciclofosfamida						
	3	5	7	10	13	17	21
1	2,80 ±0,22	7,96 ±1,10	13,38 ±1,54	11,88 ±1,92	13,30 ±1,48	12,40 ±1,76	12,90 ±2,60
2	1,06 ±0,44	4,38 ±0,77	10,50 ±3,02	6,44 ±0,60	12,20 ±3,02	12,20 ±1,80	11,86 ±1,32
3	16,50 ±8,20	16,10 ±3,20	14,80 ±3,30	15,80 ±1,90	14,90 ±2,70	16,90 ±4,70	14,70 ±2,80
4	15,70 ±4,30	15,30 ±7,80	17,30 ±5,10	15,70 ±3,80	12,50 ±3,52	17,80 ±4,70	16,30 ±3,90

ES 2 356 308 T3

Los datos obtenidos muestran que el uso de Dicarbamine en combinación con CPH permite reducir el efecto hematotóxico de esta última y acelerar la recuperación de parámetros sanguíneos.

5 7.2. Cuando se estudia el efecto de Dicarbamine sobre la acción hematotóxica de combinaciones de CPH con derivados de platino, se administró Dicarbamine diariamente por vía intragástrica a ratones durante 20 días diariamente a una dosis única de 0,5 mg/kg. Se administraron una vez preparaciones citostáticas por vía intraperitoneal en el día cinco desde el inicio del ciclo de administración de Dicarbamine. Se muestran dosis de preparaciones citostáticas en las tablas 10 y 11.

10 Los resultados de estudiar el efecto de Dicarbamine sobre el número de leucocitos en sangre periférica de ratones cuando se combinó la dosificación de CPOH con cisplatino o carboplatino se muestran en las tablas 9 y 10 respectivamente.

15

TABLA 9

El efecto de Dicarbamine sobre la hematotoxicidad de ciclofosfamida en combinación con cisplatino

20

25

30

35

40

45

50

Preparación citostática	Dosis de preparación citostática (mg/kg)	Número total de leucocitos (en miles en mm ³) a días tras la dosificación de preparaciones citostáticas					Plazos de muerte (días)
		0	3	5	7	21	
Dicarbamine							
CPH	200	11,30±	2,32±	6,60±	10,40±	12,30±	8;16
Cisplatino	8	2,30	0,49	0,90	1,54	1,56	
CPH	200	11,30±	1,20±	4,32±	6,24	10,80	3;4;7
Cisplatino	8	2,30	0,33	0,77	±1,15	±1,02	
Dicarbamine							
CPH	100	11,30±	4,14±	11,40±	14,90±	11,80±	no
Cisplatino	4	2,30	0,60	1,10	1,32	1,32	
CPH	100	11,3±	2,65±	4,74±	8,05±	12,0±	no
Cisplatino	4	2,3	0,66	0,66	0,88	1,4	
Dicarbamine							
CPH	50	1,30±	6,70±	17,00±	14,50±	12,40±	no
Cisplatino	2	2,30	1,15	5,17	2,00	0,99	
CPH	50	11,30±	4,04±	7,62±	8,72±	13,10±	no
Cisplatino	2	2,30	0,77	0,99	1,15	1,54	

55

60

65

Los datos presentados muestran que ya el día 5 en el grupo de ratones que recibió preparaciones citostáticas a dosis máximas junto con Dicarbamine, el número de leucocitos alcanzó el borde inferior de la norma fisiológica y el día 7 prácticamente se restauró hasta el nivel inicial. Sin Dicarbamine se observó la restauración sólo el día 21 de la prueba. En ratones que recibieron preparaciones citostáticas a dosis máximas sin Dicarbamine se observó la muerte de animales en los días 3, 4 y 7 de la prueba. En animales a los que se les administraron preparaciones citostáticas a dosis máximas junto con Dicarbamine, sólo se observó muerte retardada en los días 8 y 16.

ES 2 356 308 T3

TABLA 10

El efecto de Dicarbamine sobre la hematotoxicidad de ciclofosfamida en combinación con carboplatino

Preparación citostática	Dosis de prepara- ción citostá- tica (mg/kg)	Número total de leucocitos (en miles en mm ³) a días tras la dosificación de preparaciones citostáticas					Plazos de muerte (días)
		0	3	5	7	21	
Dicarbamine							
CPH	200	11,50±	3,10±	12,80±	15,30±	12,30±	10
Cisplatino	30	2,80	0,70	1,37	1,26	0,89	
CPH	200	11,30±	1,18±	4,60±	7,54±	12,60±	3
Cisplatino	30	2,30	0,49	0,60	0,77	1,28	
Dicarbamine							
CPH	100	11,50±	4,04±	10,40±	14,80±	11,80±	no
Cisplatino	15	2,80	0,44	1,59	1,76	1,34	
CPH	100	11,30±	2,74±	6,48±	10,50±	13,20±	no
Cisplatino	15	2,30	0,49	0,60	1,38	1,50	
Dicarbamine							
CPH	50	11,30±	6,60±	10,90±	11,20±	10,90±	no
Cisplatino	7,5	2,30	0,77	1,21	1,20	1,28	
CPH	50	11,50±	3,94±	8,72±	10,80±	11,20±	no
Cisplatino	2	2,80	1,04	1,98	2,40	0,99	

Los datos presentados muestran (tabla 10) que en caso de usar Dicarbamine junto con carboplatino y ciclofosfano a las dosis letales, el número de leucocitos en sangre periférica y los plazos de muerte de animales son similares a los datos presentados en la tabla 9.

Por tanto, Dicarbamine inhibe el desarrollo de leucopenia en todos los ciclos estudiados, acelera la recuperación del número total de leucocitos y retarda el plazo de muerte de ratones cuando se usan preparaciones citostáticas a dosis letales.

7.3. Cuando se estudia el efecto de derivados peptídicos de fórmula general (I) sobre la acción hematotóxica de combinaciones de CPH con carboplatino, los compuestos se administraron por vía intragástrica a ratones diariamente a la dosis de 0,5 mg/kg durante 10 días. En el día cinco tras iniciar la administración de los compuestos sometidos a prueba se les inyectó a los ratones por vía intraperitoneal CPH a una dosis de 200 mg/kg y carboplatino a una dosis única de 15 mg/kg. Después se continuó con la administración de los compuestos sometidos a prueba durante 5 días más.

Antes de iniciar la dosificación de los compuestos sometidos a prueba, se extrajo sangre de la cola de ratones para calcular el número total de leucocitos. En los días 3, 5 y 7 tras la administración de ciclofosfamida con carboplatino también se extrajo sangre de la cola de ratones para calcular el número total de leucocitos. Cada grupo incluía 15 animales.

Como control se usó un grupo de ratones que sólo recibió preparaciones citostáticas.

Los datos presentados en la tabla 11 muestran que los derivados peptídicos de fórmula general (I) inhiben el desarrollo de leucocitopenia y aceleran la recuperación del número total de leucocitos.

ES 2 356 308 T3

TABLA 11

El efecto de derivados peptídicos de fórmula general (I) sobre la acción hematotóxica de la combinación de ciclofosfamida con carboplatino

5

10

15

20

25

30

35

40

N.º de compuesto	Número total de leucocitos en sangre periférica (en miles en mm ³) a días tras la dosificación de preparaciones citostáticas			
	0	3	5	7
1	13,3±3,5	3,3±1,0*	10,0±1,3*	11,6±2,5*
2	13,8±3,5	3,18±0,82*	9,1±0,5*	11,9±2,5*
3	15,5±3,2	4,18±2,0	19,2±1,9	17,5±1,7*
4	15,3±2,7	3,02±0,83	9,62±3,84	16,1±0,15
5	12,1±1,4	2,1±1,04	10,5±2,08	15,2±1,23
6	14,2±1,1	3,04±1,61	14,56±2,65	25,68±3,1*
7	13,7±1,1	3,14±0,62	13,7±0,57	16,58±2,9
8	12,9±2,5	3,98±0,78	10,8±0,57	16,16±0,85
9	13,2±3,0	5,04±0,20*	8,64±1,97	19,38±1,8
10	12,9±1,9	5,18±1,97*	19,76±3,22*	21,82±3,74*
11	14,8±2,3	3,32±1,3	10,28±1,35	17,56±2,6
12	12,8±0,8	3,56±0,12	20,66±3,7*	17,4±2,8
13	14,9±0,6	2,66±0,21	25,7±4,1*	32,1±4,87*
14	13,8±0,5	2,66±0,23	16,24±2,3	28,9±3,65*
15	12,7±0,7	3,76±0,14	26,4±5,8*	27,6±4,12*
16	12,6±0,6	3,9±0,23	15,44±1,3	24,9±4,31*
17	13,4±0,8	3,36±0,27	17,6±3,1	26,1±3,97*
CPH+C	16,1±3,5	1,14±0,55	4,31±1,3	8,3±0,58

*significativo a $p \sim 0,05$

45

7.4. El efecto de Dicarbamine sobre la diferenciación celular está respaldado por el estudio del número diferencial de sangre periférica en ratones bajo efecto de ciclofosfamida en combinación con Dicarbamine en comparación con la dosificación de ciclofosfamida sola.

50

Se usan dos grupos de ratones. Al grupo uno se le administra Dicarbamine a una dosis de 0,5 mg/kg 5 días antes de y 5 días tras la administración de CPH a una dosis de 200 mg/kg. Al grupo dos de ratones se le administra CPH sola a una dosis de 200 mg/kg. Los resultados de los estudios se muestran en las tablas 12 y 13.

55

Los datos presentados en las tablas 12 y 13 muestran que se produce la recuperación de sangre periférica debido al estallido de formas maduras lo que confirma el efecto de diferenciación de Dicarbamine. Esto se observa especialmente en los días 3 y 5 por el número de sangre periférica y la celularidad de la médula ósea (tablas 12 y 13). En el grupo con Dicarbamine están ausentes mielocitos y neutrófilos en banda en sangre periférica y en el grupo sin Dicarbamine están presentes estas formas de elementos (tabla 12).

60

Ejemplo 8

Disminución en la tasa de y dimensiones de eritroblastosis por virus de Friend (FEB) inoculada por vía subcutánea en ratones efectuada por derivados peptídicos

65

Los estudios se llevaron a cabo en 100 híbridos de ratones macho BDF₁ que se dividieron en grupos que contenían 10 ratones cada uno. Se usaron ratones DBA₂ lineales para el pase de FEB *in vivo*.

ES 2 356 308 T3

Se obtuvo una cepa de eritroblastosis por virus de Friend del banco de cepas tumorales del GU RCRC denominado después N.N. Blokhin de la RAMS, se hizo pasar dos veces por vía intraperitoneal usando generaciones 3-8 en inoculación subcutánea. Se realizó la inoculación usando una suspensión celular a una cantidad de 1×10^6 en 0,3 ml de medio 1999.

5

Se administraron por vía intragástrica diariamente disoluciones de los compuestos sometidos a prueba a ratones usando una sonda desde el día 3 hasta el día 7 tras la inoculación de tumores.

Se evaluó la eficacia de la terapia basándose en la inhibición de crecimiento tumoral (TGI, %) y una vida útil promedio (ALS). Se determinó el aumento de vida útil mediante el criterio comúnmente aceptado T/C (%) que se calculó como razón entre ALS en los grupos de prueba y control. Se calculó la tasa de crecimiento tumoral V_t/V_1 basándose en la dinámica de cambio en volúmenes promedio de tumores.

Los datos de los estudios sobre el efecto de derivados péptidos sobre el tamaño del tumor y sobre la tasa de crecimiento tumoral se muestran en las tablas 14 y 15, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que los derivados peptídicos provocan la inhibición del crecimiento de FEB inoculada por vía subcutánea durante 19 días tras la finalización de la terapia. Dicho efecto empezó a registrarse inmediatamente tras la finalización de la administración de compuestos a una dosis única de 1,5 mg/kg y se mantuvo a un nivel significativo ($p < 0,05$) hasta el día 13. La tasa de crecimiento tumoral se estabilizó durante una semana tras la retirada de los compuestos.

Se estableció como resultado de los estudios llevados a cabo que los compuestos de fórmula general (I) tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de nudo subcutáneo por FEB. Los datos obtenidos permiten considerar que los compuestos de prueba son útiles para terapia de hemoblastosis humanas.

25

Ejemplo 9

30 *El efecto de Dicarbamine y 2α -interferón (Reaferon) sobre células tumorales de eritroblastosis por virus de Friend*

Se investigó la eritroblastosis por virus de Friend que se inoculó por vía subcutánea a ratones hembra DBA₂ a través de células de bazo.

35 Se llevaron a cabo 4 grupos de pruebas.

Grupo 1 - animales control sin terapia, se administró una solución salina fisiológica;

40 grupo 2 - se administró diariamente por vía s.c. Reaferon a una dosis de 100 mil UI/kg desde el día 3 hasta el día 7 tras la inoculación;

grupo 3 - se administró por vía p.o. Dicarbamine a una dosis única de 4,5 mg/kg desde el día 3 hasta el día 7 tras la inoculación;

45 grupo 4 - se administraron simultáneamente Dicarbamine y Reaferon según un esquema similar.

Se tomó material para microscopía óptica en animales sacrificados los días 3, 7 y 14 tras la finalización de terapia o administración de una solución salina fisiológica, se tomó material para microscopía electrónica los días 7 y 14.

50

Para un examen histológico se fijaron fragmentos de tumor en formalina neutra al 10% y se incrustaron en parafina; los cortes obtenidos se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron para determinar el contenido en glicógeno (polisacáridos) usando reacción de Schiff con ácido peryódico, para determinar el contenido en ARN según Brachet, para determinar lípidos y hierro. Se observaron los cortes a través de y se fotografiaron en el microscopio óptico Polivar (Austria).

55

Para microscopía electrónica se fijaron fragmentos de tumor en disolución de glutaraldehído al 2,5% y tetraóxido de osmio al 1%, se incrustaron en EPON-812. Se prepararon cortes semigruesos y ultragruesos en el ultratome LKB-III (Suecia). Los cortes semigruesos obtenidos se tiñeron con azul de toluidina y se observaron a través del microscopio óptico. Los cortes ultragruesos se tiñeron adicionalmente con acetato de uranilo y citrato de plomo; se observaron los cortes a través de y se fotografiaron en el microscopio electrónico JEOL 1200 EX-II (Japón).

60

Se calculó el porcentaje de células con diferentes tipos de diferenciación (blastocitos, linfocitos y leucocitos granulares) durante microscopía electrónica para una evaluación cuantitativa.

65

Se evaluaron el porcentaje de mitosis y células con apoptosis así como las zonas de necrosis durante el examen histológico.

ES 2 356 308 T3

Examen histológico

Grupo I

5 *Animales control sin terapia*

En el examen histológico se encontró que las células tumorales son grandes, polimorfas, sus núcleos son claros, el citoplasma está desarrollado moderadamente. El tamaño celular algunas veces fluctúa y se encuentran células más pequeñas individuales pero las células grandes representan la principal masa de células.

10

Las células tumorales forman excrecencias continuas. En tumores individuales se encuentran sitios de necrosis que rodean campos conservados de células tumorales. La zona de necrosis no superó el 10-15% de la superficie del corte.

15

En la mayoría de las células tumorales la reacción de Brachet para ARN es muy pronunciada, con menos frecuencia es débil o está ausente (en células pequeñas individuales).

La reacción de Schiff con ácido peryódico tenía carácter difuso, la reacción para dar hierro era positiva sólo en células individuales.

20

En el tumor entre células grandes se encontraron mitosis (hasta el 1-1,5%) y células con signos de apoptosis (hasta el 0,5%).

25

Según crecía el tumor, aumentaba la zona de necrosis hasta el 20-30% de la superficie del corte, el número de mitosis aumentó (hasta el 1,5-2%), la actividad de apoptosis no cambió. El número de células polimorfas grandes prevaleció significativamente en todos los plazos.

Grupo II

30 *Administración de Reaferon*

Los tumores tienen una estructura histológica habitual. Como en el control, entre células polimorfas grandes se encuentran células más pequeñas con núcleo hiper cromático.

35

En el día 14, la zona de necrosis es el 40-50% de la superficie del corte, la actividad mitótica es del 0,5-1%, en el día 7 aumentó la apoptosis hasta el 1-2%, pero en el día 14 disminuyó hasta el 1-1,5%.

Grupo III

40

Administración de Dicarbamine

Se observa el aumento en la cantidad de células tumorales pequeñas con núcleos hiper cromáticos. La cantidad de células polimorfas grandes prevalece significativamente. La zona de necrosis no cambió significativamente en comparación con la imagen del grupo I. La actividad mitótica también permaneció dentro de los límites de las figuras del control. En los días 3 y 7 la tasa de apoptosis disminuyó ligeramente (hasta el 0,1-0,5% en el día 7).

Grupo IV

50

Administración simultánea de Dicarbamine y Reaferon

La zona de necrosis y la actividad mitótica no mostraron cambios significativos en comparación con los cambios en el grupo II. En el día 3 la apoptosis disminuyó hasta el 0,2-0,5%, en los días 7 y 14 es del 0,5% (como en el control).

55

Las células polimorfas grandes de tipo blastocito prevalecen significativamente en el tumor.

Microscopía electrónica

60

Grupo I

Animales control sin tratamiento

65

Las células con baja diferenciación polimorfas grandes de tipo blastocito se encuentran principalmente en el tumor durante la microscopía electrónica. Los núcleos en estas células tienen forma redonda o ligeramente irregular ocasionalmente con superficie poco uniforme. Habitualmente se observa la distribución difusa de cromatina en ellas, sólo en algunas de ellas se observa la formación de heterocromatina ubicada marginalmente. Los núcleos habitualmente

ES 2 356 308 T3

ocupan una parte importante del citoplasma en el que prevalecen ribosomas, mitocondrias individuales, ocasionalmente las estructuras del retículo endoplásmico ligeramente rugosas. Los blastocitos ascienden al 90-95% de toda la población tumoral.

5 Además de los blastocitos, se encuentran linfocitos de diferente grado de madurez, es decir linfoblastos, linfocitos (grandes, medianos, pequeños). Los núcleos en estas células son redondeados, ovales, con frecuencia con superficie poco uniforme, comprenden heterocromatina en forma de acumulaciones grandes, se encuentran nucléolos. El citoplasma está moderadamente desarrollado, comprende una gran cantidad de ribosomas; hay pocos orgánulos de otro tipo, ocasionalmente se encuentran gránulos densos.

10 Los leucocitos granulares son gránulos pequeños, característicos de neutrófilos, con menos frecuencia pueden verse eosinófilos en el citoplasma. Los núcleos en estas células están segmentados o tienen concavidades profundas. Ocasionalmente pueden observarse células que tienen gránulos en el citoplasma, un núcleo irregular y una membrana plasmática sobresaliente en forma de protuberancias (monocitos). Se encontraron glóbulos rojos que estaban libremente en el tumor.

Los blastocitos grandes prevalecen principalmente en el tumor (hasta el 90-95%). Se encuentran células linfoides dentro del intervalo del 4-8%, las células granulares ascienden al 1-2%.

20 No se observaron cambios significativos en la razón entre tipos celulares diferentes a medida que el tumor crecía tras el injerto.

Grupo II

25 *Administración de Reaferon*

Se conserva la ultraestructura general de células tumorales de diferente tipo.

30 La cantidad de blastocitos grandes no disminuye, las células linfoides ascienden hasta el 4-8%, los leucocitos granulares ascienden hasta el 1-2%. Están presentes glóbulos rojos individuales en el tumor.

Grupo III

35 *Administración de Dicarbamine*

La ultraestructura de células tumorales de diferente tipo se mantiene como anteriormente. Su razón cuantitativa cambia y el nivel de diferenciación aumenta un poco. La cantidad de células de tipo blastos grandes disminuye hasta el 70-80%, la cantidad de linfocitos y granulocitos aumenta hasta el 18-25% y el 2-5% respectivamente. Están presentes glóbulos rojos individuales en el tumor.

Los cambios hallados de manera más constante se encuentran en el día 7 tras la finalización del tratamiento.

45 *Grupo IV*

Administración de Reaferon y Dicarbamine

50 La ultraestructura de células tumorales de diferente tipo prácticamente corresponde a lo que se describió anteriormente (véase el grupo I).

55 La cantidad de células de tipo blastos grandes fluctúa dentro del intervalo del 70-80%. El número de linfocitos alcanza el 18-25%, la cantidad de leucocitos se mantiene al nivel del 2-5%. Se encuentran glóbulos rojos que están entre las otras células.

Tal como en los grupos anteriores, los cambios encontrados son lo más pronunciados en el día 7.

60 Por tanto, se estableció que Dicarbamine administrada por vía oral a ratones con eritroblastosis por virus de Friend a una dosis de 4,5 mg/kg diariamente durante 5 días provocaba la diferenciación de células tumorales inmaduras principalmente en la dirección de formar granulocitos así como células de linaje eritroide.

65 En comparación con tumores de los animales control, cuando se usó Dicarbamine, la cantidad de células tumorales inmaduras disminuyó hasta desde el 90-95% hasta el 70-80%, es decir en un 15-20% y la cantidad de linfocitos aumentó desde el 4-8% hasta el 18-25%, es decir 4 veces.

La cantidad de células de linaje granulocítico aumentó menos significativamente (desde el 1-2% hasta aproximadamente el 2-5%).

ES 2 356 308 T3

Debe observarse que los cambios más frecuentes se encontraron en el día 7 tras la finalización del tratamiento. En el día 14 tras la finalización del tratamiento estos cambios se estabilizaron.

5 Reaferon en administración subcutánea durante 5 días a una dosis de 100 mil UI/kg provocó un aumento en la zona de necrosis en el tumor (desde el 15-20% en el grupo control hasta el 40-50% en la prueba en el día 7 tras la finalización del tratamiento y desde el 20-30% hasta el 40-50% en el día 14). La tasa de mitosis disminuyó un poco (desde el 1,5-2% hasta el 0,5-1%) y la cantidad de células con signos de apoptosis aumentó (desde el 0,5% hasta el 1-2% en el día 7 tras la finalización del tratamiento). La diferenciación de células tumorales prácticamente no cambió.

10 En la administración simultánea de Dicarbamine y Reaferon en las mismas dosis y en los mismos plazos se encontró la suma del efecto de cada preparación. Se observó la potenciación de diferenciación de blastocitos inmaduros característica del efecto de Dicarbamine sola así como se encontraron un crecimiento de la zona de necrosis y una disminución en el número de mitosis que se observaban en la administración de Reaferon solo.

15 Por tanto, se ha establecido que Dicarbamine puede potenciar la diferenciación de células hematopoyéticas tumorales inmaduras de eritroblastosis por virus de Friend en diferentes direcciones en particular con formación de células tumorales de linaje linfoide y mieloide.

20 El efecto de Dicarbamine sobre la diferenciación celular representa su propiedad general como se observó anteriormente en el ejemplo del estudio de melanoma.

Ejemplo 10

25 *Microscopía electrónica del efecto protector de Dicarbamine con respecto a células hematopoyéticas de la médula ósea y sangre periférica en pacientes con cánceres de ovario durante la quimioterapia*

30 En los estudios anteriores dedicados a estudiar el mecanismo de acción de Dicarbamine sobre la médula ósea, se encontró que la preparación proporcionada protegía la médula ósea en animales en condiciones de prueba contra el efecto citotóxico adverso de ciclofosfamida reduciendo la apoptosis en células hematopoyéticas normales.

Se obtuvieron datos similares en las biopsias por punción de médula ósea y sangre periférica de 10 pacientes con cáncer de ovario en estadio III-IV.

35 Se dividieron los pacientes en dos grupos iguales: grupo I - pacientes que recibieron la quimioterapia sola y grupo II - pacientes que recibieron la quimioterapia junto con administración de Dicarbamine.

40 Los pacientes en los grupos I y II recibieron 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino durante el primer día de terapia; se repitieron los ciclos con intervalo de 3-4 semanas. El promedio de ciclos de quimioterapia de un paciente incluía 6 ciclos sin Dicarbamine y 5,7 ciclos con Dicarbamine.

45 En el grupo II los pacientes recibieron la quimioterapia junto con Dicarbamine con dosificación a una dosis única de 100 mg empezando 5 días antes del primer ciclo y después hasta el inicio del siguiente ciclo a la misma dosis. La duración del uso de Dicarbamine entre dos ciclos promedió 24,5 días. La dosis total promedio era de 2,5 gramos.

La biopsia por punción de la médula ósea y sangre periférica para microscopía electrónica se tomaron en pacientes antes de la quimioterapia al inicio y al final del ciclo del tratamiento con Dicarbamine o sin ella.

50 Las biopsias por punción de médula ósea frescas se colocaron sobre un portaobjetos y muchas veces se agitaron con varilla de agitación hasta que se obtuvieron fragmentos densos pequeños. Estos últimos se fijaron en una disolución de glutaraldehído al 2,5% fijada adicionalmente en una disolución de tetraóxido de osmio al 1%; tras el lavado con tampón fosfato a pH 7,4 se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y se incrustaron en la mezcla de resinas epoxídicas EPON-812. Se prepararon cortes semigruesos y ultragruesos en el ultratome LKB-III (Suecia). Los cortes semigruesos se tiñeron con azul de metileno o toluidina, los cortes ultragruesos se contrastaron con disolución acuosa de acetato de uranilo y citrato de plomo.

60 Se centrifugó sangre periférica que comprendía heparina durante 1 hora a 3.000 rpm. Después se vertió una disolución de glutaraldehído al 2,5% sobre la superficie de la película formada durante 10-15 minutos, se retiró la película y se continuó con el tratamiento tal como se describió anteriormente.

Se observaron cortes delgados en el microscopio óptico Polivar (Austria) y se observaron cortes delgados en el microscopio electrónico JEOL-1200-CX-11 (Japón).

65 1. *Estudios control antes de iniciar la quimioterapia y administración de Dicarbamine. Pacientes de grupos I y II*

Se encuentran células hematopoyéticas de diferente grado de madurez y dirección de diferenciación en biopsias por punción de la médula ósea estando una parte de la célula con los signos de vacuolización y distrofia.

ES 2 356 308 T3

Hay blastocitos no diferenciados de tamaño grande con borde de citoplasma estrecho que comprende principalmente ribosomas. En estas células un núcleo de forma oval redondeada con cromatina difusa y nucléolos individuales ocupa la parte principal del citoplasma.

5 Una parte de las células se diferencia en la dirección de linaje granulocítico de leucocitos de diferente tipo y grado de diferenciación.

Se observan promielocitos y mielocitos con núcleos ovales redondeados, cromatina difusa que comprende en el citoplasma una cantidad diferente de gránulos específicos. Con frecuencia se sitúan glóbulos rojos y granulocitos más maduros alrededor de estas células.

Se observan con frecuencia acumulaciones de granulocitos más diferenciados, es decir neutrófilos en banda y neutrófilos segmentados. Los gránulos específicos de diferente tipo característicos de neutrófilos, eosinófilos y basófilos están presentes en su citoplasma.

15 Las células linfoides de diferente grado de diferenciación (pequeño, medio, grande - linfoblástico) se disponen entre granulocitos.

Se encuentran muchos glóbulos rojos maduros, que tienen con frecuencia diferente forma así como normoblastos que comprenden núcleos y plaquetas.

2. Médula ósea tras la quimioterapia con ciclofosfano y carboplatino - grupo I

25 En las células hematopoyéticas conservadas de diferente tipo (granulocitos, linfocitos, normocitos, glóbulos rojos, plaquetas) se encuentran signos de distrofia y bajo grado de madurez en las biopsias por punción de médula ósea tomadas tras el ciclo de quimioterapia.

En los blastocitos, el citoplasma contiene ribosomas y con frecuencia está vacuolado. Los núcleos son grandes con cromatina difusa o acumulaciones de heterocromatina, ocasionalmente de forma irregular y con sitios estirados dentro.

La cantidad de gránulos específicos en promielocitos y mielocitos no es significativa y el citoplasma con frecuencia tiene cambios distróficos pronunciados.

35 En los granulocitos conservados de tipo banda y segmentado, también se observan cambios distróficos y una cantidad no significativa de gránulos específicos. Con frecuencia los presentes gránulos también se modifican de manera distrófica y están vacuolados.

40 Los normoblastos conservados son con frecuencia de forma irregular con protuberancias y proyecciones de citoplasma.

Debe observarse que en biopsias de médula ósea por punción especialmente entre granulocitos se encontraron células con signos de apoptosis. En tales células se observaron la marginación de heterocromatina, los signos de la fragmentación del núcleo y citoplasma y la formación de cuerpos apoptóticos.

3. Médula ósea tras la quimioterapia con ciclofosfano y carboplatino junto con administración de Dicarbamine - grupo II

50 En biopsias de médula ósea por punción de pacientes que se sometieron a la quimioterapia junto con administración de Dicarbamine se encontraron células hematopoyéticas de diferente grado y tipo de diferenciación (granulocitos, linfocitos, plaquetas, normoblastos).

55 Las células de tipo blastos son grandes, contienen núcleos redondeados con cromatina difusa y nucléolos individuales, su citoplasma es estrecho y en el mismo se observan ribosomas, mitocondrias individuales y ocasionalmente gránulos densos primarios simples.

60 Hay muchos promielocitos y mielocitos que comprenden núcleos redondeados u ovales con cromatina difusa o condensada; su citoplasma comprende una cantidad bastante grande de gránulos específicos tanto primarios (oscuros) como menos maduros (más maduros).

También se encuentran frecuentemente leucocitos en banda y segmentados. Tienen un núcleo cóncavo (similar a una judía) o segmentado, abundancia de gránulos específicos de tipo predominantemente neutrófilo en su citoplasma, con menos frecuencia de tipo eosinófilo con estructuras cristaloides.

65 Los linfocitos de diferente grado de diferenciación comprenden en el citoplasma mitocondrias, estructuras de retículo endoplásmico rugoso, ocasionalmente inclusiones simples en forma de gránulos simples.

ES 2 356 308 T3

Las células de tipo granulocítico, linfocitos forman con frecuencia acumulaciones compactas.

Junto con glóbulos rojos, se encuentran normoblastos de diferente grado de diferenciación y de forma relativamente habitual.

Raramente, se encuentran células con signos de apoptosis.

Las mismas regularidades de la composición que se describieron anteriormente para elementos de médula ósea se encontraron en células hematopoyéticas en estudio de sangre periférica.

La microscopía electrónica comparativa llevada a cabo de células hematopoyéticas de médula ósea y sangre periférica en pacientes con cáncer de ovario antes y después de la quimioterapia combinada (ciclofosfamida + carboplatino) y durante la quimioterapia junto con dosificación de Dicarbamine permitió establecer mecanismos de su efecto protector a partir de la influencia citotóxica de las preparaciones usadas.

El estudio mostró que las preparaciones de quimioterapia usadas en el presente trabajo ejercen un efecto citotóxico pronunciado sobre diferentes tipos de células hematopoyéticas de linaje granulocítico, linfoide y eritroide.

Este efecto citotóxico se expresa en forma de cambios distróficos en el citoplasma y la muerte de gránulos específicos que se desarrollan en células de la médula ósea (y sangre periférica respectivamente).

Dichos trastornos afectan especialmente a células granulocíticas y en menor grado a células linfoides en estadios tempranos de su diferenciación, es decir formación de blastocitos, promielocitos, mielocitos, linfoblastos, e implican linaje eritroide así como dan como resultado la acumulación insuficiente de formas competentes funcionalmente diferenciadas de células hematopoyéticas.

Además, según se encontró en los elementos de linaje granulocítico se potencia la muerte celular programada genéticamente, es decir apoptosis.

Los cambios distróficos y la apoptosis generalmente dan como resultado el desarrollo de leucopenia, neutropenia, trombocitopenia y otros trastornos del estado de hematopoyesis y limitan las capacidades de la quimioterapia.

Basándose en el estudio llevado a cabo, se estableció que Dicarbamine protegía células hematopoyéticas de la médula ósea (y sangre periférica respectivamente) frente al efecto citotóxico de las preparaciones usadas para quimioterapia, promovía la diferenciación de formas jóvenes para dar elementos celulares maduros y reducía los eventos de apoptosis.

Como resultado del efecto encontrado de Dicarbamine, en la médula ósea de pacientes durante la quimioterapia se produce la acumulación de formas jóvenes (blastos) de células hematopoyéticas y lo que es especialmente importante, se potencia su diferenciación para dar formas funcionalmente competentes.

Por tanto, en las condiciones de la quimioterapia, la estimulación de la diferenciación de células hematopoyéticas de la médula ósea, especialmente de células de linaje granulocítico, y la prevención del crecimiento de apoptosis son los mecanismos subyacentes al efecto protector de Dicarbamine.

Ejemplo 11

La eficacia de Dicarbamine con respecto a la reducción de la toxicidad hematológica de la quimioterapia en cáncer de ovario

Se estudió el efecto de Dicarbamine en 13 pacientes con cáncer de ovario en estadio III-IV que se sometieron a 77 ciclos de quimioterapia según el esquema: 400 mg/m² de carboplatino por vía i.v. gota a gota, una vez + 600 mg/m² de ciclofosfano por vía i.v. gota a gota, una vez; se repitieron los ciclos a los 28 días. Se prescribió Dicarbamine diariamente a una dosis de 100 mg por vía oral tras las comidas empezando 5 días antes del primer ciclo y después durante tres semanas. La duración de dosificación fue de 26 días, siendo la dosis del ciclo 2600 mg. Se proporcionó Dicarbamine de nuevo 5 días antes del segundo ciclo de quimioterapia y se continuó la dosificación durante 21 días. La duración total de la toma de Dicarbamine durante dos ciclos de quimioterapia fue de 52 días.

Se evaluó la toxicidad hematológica (leucopenia, neutropenia, trombocitopenia) en 13 pacientes que recibieron 77 ciclos de la quimioterapia con Dicarbamine en comparación con el grupo de 7 pacientes que recibieron 25-27 ciclos de la quimioterapia sin Dicarbamine (control).

Se evaluaron los parámetros de hematopoyesis dinámicamente muchas veces antes y después de llevar a cabo la quimioterapia (control) así como dinámicamente antes y después de la dosificación de Dicarbamine en el grupo de prueba. A continuación se presentan parámetros de hematopoyesis en pacientes individuales que recibieron la quimioterapia según el esquema indicado con Dicarbamine o sin él.

ES 2 356 308 T3

8.1. Pacientes que recibieron la quimioterapia sin Dicarbamine

Mujer de 51 años de edad, diagnóstico: cáncer de ovario en estadio III; recibió el primer ciclo de la quimioterapia según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino una vez. Análisis de sangre completa, ciclo 1 de la quimioterapia

10

15

20

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio del ciclo 1 de la quimioterapia	5 días tras el ciclo 1 de la quimioterapia	2 semanas tras el ciclo 1 de la quimioterapia	3 semanas tras el ciclo 1 de la quimioterapia
Leucocitos 10 ⁹ /l	4,5	3,8	2,2	2,0
Neutrófilos 10 ⁹ /l	2,9	2,4	0,9	0,8
Plaquetas	168	160	154	150

El segundo ciclo de terapia se retrasó en 7 días debido a neutropenia.

25

El segundo ciclo de la quimioterapia según el esquema de terapia era tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano + 400 mg/m² de carboplatino una vez, sin Dicarbamine.

Análisis de sangre completa, ciclo 2 de la quimioterapia

30

35

40

45

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio del ciclo 2 de la quimioterapia	5 días tras el ciclo 2 de la quimioterapia	2 semanas tras el ciclo 2 de la quimioterapia	3 semanas tras el ciclo 2 de la quimioterapia
Leucocitos 10 ⁹ /l	3,5	3,3	2,0	2,1
Neutrófilos 10 ⁹ /l	2,2	2,0	0,8	0,9
Plaquetas	178	170	154	150

El tercer ciclo se retrasó debido a neutropenia.

50

Mujer de 63 años de edad, diagnóstico: cáncer de ovario en estadio IV, afectación metastásica de un ganglio linfático de la ingle derecha, ascitis; recibió el primer ciclo de la quimioterapia según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano + 400 mg/m² de carboplatino una vez, sin Dicarbamine.

Análisis de sangre completa, ciclo 1 de la quimioterapia

55

60

65

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	5 días tras el ciclo 1 de QT	2 semanas tras el ciclo 1 de QT	3 semanas tras el ciclo 1 de QT
Leucocitos 10 ⁹ /l	5,0	3,9	2,1	2,0
Neutrófilos 10 ⁹ /l	3,2	1,7	0,9	1,0
Plaquetas	160	150	151	152

ES 2 356 308 T3

El segundo ciclo de terapia se retrasó durante 4 días debido a leuco y neutropenia.

El segundo ciclo de la quimioterapia se llevó a cabo según el esquema de terapia y era tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano + 400 mg/m² de carboplatino una vez, sin Dicarbamine.

Análisis de sangre completa, ciclo 2 de la quimioterapia

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio del ciclo 2 de QT	5 días tras el ciclo 2 de QT	2 semanas tras el ciclo 2 de QT	3 semanas tras el ciclo 2 de QT
Leucocitos 10 ⁹ /l	3,7	2,9	2,0	2,2
Neutrófilos 10 ⁹ /l	2,2	1,8	0,9	0,9
Plaquetas	166	160	140	155

El tercer ciclo se retrasó debido a neutropenia.

8.2. Pacientes que recibieron la quimioterapia junto con Dicarbamine

Mujer de 51 años de edad, diagnóstico: cáncer de ovario en estadio III; recibió el primer ciclo de la quimioterapia según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino en el día 1 de terapia. Se prescribió Dicarbamine diariamente a una dosis de 100 mg empezando 5 días antes del ciclo 1 de la quimioterapia y después durante 21 días. El período de terapia con Dicarbamine fue de 26 días antes del ciclo 2.

Análisis de sangre completa, ciclo 1 de la quimioterapia con Dicarbamine

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio de la administración de Dicarbamine	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	Tras la finalización de la toma de Dicarbamine	Tras el ciclo 2 de QT
	Día "0"	Día 5	Día 21	Día 33
Leucocitos 10 ⁹ /l	5,9	5,5	4,7	4,0
Neutrófilos 10 ⁹ /l	4,2	4,0	3,3	2,9
Plaquetas	170	164	160	158

El ciclo 2 de la quimioterapia se llevó a cabo en el tiempo según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino una vez en el día 28 tras llevarse a cabo el primer ciclo de la quimioterapia + Dicarbamine. Se administró Dicarbamine a una dosis de 100 mg durante 5 días antes del ciclo 2 y después diariamente durante 21 días. La duración total de la toma de Dicarbamine (2 ciclos de la quimioterapia) fue de 52 días.

Análisis de sangre completa, ciclo 2 de la quimioterapia

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio de la administración de Dicarbamine	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	Tras la finalización de la toma de Dicarbamine	Tras el ciclo 3 de QT
	Día 28 tras el ciclo 1 de QT	Día 33	Día 54	Día 61
Leucocitos 10 ⁹ /l	4,9	5,0	4,2	4,2
Neutrófilos 10 ⁹ /l	3,2	3,3	3,1	3,0
Plaquetas	180	170	160	160

ES 2 356 308 T3

El tercer ciclo de QT se proporcionó a tiempo.

Mujer de 75 años de edad, diagnóstico: cáncer de ovario en estadio III, ascitis; recibió la quimioterapia con Dicarbamine según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino en el día 1 de terapia. Se prescribió Dicarbamine a una dosis de 100 mg diariamente empezando 5 días antes del ciclo 1 de QT y después durante 21 días. El período de terapia con Dicarbamine fue de 26 días antes del ciclo 2.

Análisis de sangre completa, ciclo 1 de la quimioterapia con Dicarbamine

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio de la administración de Dicarbamine	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	T r a s l a finalización de la toma de Dicarbamine	Tras el ciclo 2 de QT
	Día "0"	Día 5	Día 21	Día 33
Leucocitos 10 ⁹ /l	7,4	7,2	6,6	5,2
Neutrófilos 10 ⁹ /l	5,7	5,0	5,2	3,8
Plaquetas	174	165	162	167

El ciclo 2 de la quimioterapia se llevó a cabo a tiempo según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino una vez en el día 28 tras llevarse a cabo el primer ciclo de la quimioterapia + Dicarbamine. Se administró Dicarbamine a una dosis de 100 mg durante 5 días antes del ciclo 2 y después diariamente durante 21 días. La duración total de la toma de Dicarbamine (2 ciclos de la quimioterapia) fue de 52 días.

Análisis de sangre completa, ciclo 2 de la quimioterapia

Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio de la administración de Dicarbamine	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	T r a s l a finalización de la toma de Dicarbamine	Tras el ciclo 3 de QT
	Día 28 tras el ciclo 1 de QT	Día 33	Día 54	Día 61
Leucocitos 10 ⁹ /l	7,8	8,2	7,6	7,2
Neutrófilos 10 ⁹ /l	5,2	6,0	6,2	5,8
Plaquetas	165	160	162	157

El tercer ciclo de QT se proporcionó en el plazo.

Mujer de 65 años de edad, diagnóstico: cáncer de ovario en estadio IV, ascitis, afectación metastásica de la región umbilical; recibió la quimioterapia con Dicarbamine según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino en el día 1 de terapia. Se prescribió Dicarbamine a una dosis de 100 mg diariamente empezando 5 días antes del ciclo 1 de QT y después durante 21 días. El período de terapia con Dicarbamine fue de 26 días antes del ciclo 2.

ES 2 356 308 T3

Análisis de sangre completa, ciclo 1 de la quimioterapia con Dicarbamine

5	Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio de la administración de Dicarbamine	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	Tras la finalización de la toma de Dicarbamine	Tras el ciclo 2 de QT
10		Día "0"	Día 5	Día 21	Día 33
	Leucocitos $10^9/l$	6,6	5,9	5,5	5,0
	Neutrófilos $10^9/l$	5,0	4,2	4,4	3,4
15	Plaquetas	170	172	166	164

El ciclo 2 de la quimioterapia se llevó a cabo a tiempo según el esquema de terapia tal como sigue: 600 mg/m² de ciclofosfano y 400 mg/m² de carboplatino una vez en el día 28 tras llevarse a cabo el primer ciclo de la quimioterapia + Dicarbamine. Se administró Dicarbamine a una dosis de 100 mg durante 5 días antes del ciclo 2 y después diariamente durante 21 días. La duración total de la toma de Dicarbamine (2 ciclos de la quimioterapia) fue de 52 días.

Análisis de sangre completa, ciclo 2 de la quimioterapia

25	Parámetro, unidades de medición	Antes del inicio de la administración de Dicarbamine	Antes del inicio del ciclo 1 de QT	Tras la finalización de la toma de Dicarbamine	Tras el ciclo 3 de QT
30		Día 28 tras el ciclo 1 de QT	Día 33	Día 54	Día 61
	Leucocitos $10^9/l$	5,6	5,8	5,7	5,5
	Neutrófilos $10^9/l$	3,0	3,2	3,4	3,2
40	Plaquetas	170	170	176	165

El tercer ciclo de QT se proporcionó en el plazo.

8.3. Datos comparativos sobre toxicidad hematológica en pacientes que recibieron la quimioterapia y los que recibieron o no recibieron Dicarbamine se muestran en las tablas 16 y 17

TABLA 16

Número (%) de pacientes con toxicidad hematológica que recibieron la quimioterapia sin Dicarbamine

Tipo de toxicidad	Número de ciclos de QT	Grado de toxicidad hematológica según la OMS					
		0	I	II	III	IV	III+IV
Leucopenia	26	3 11,5%	5 19,2%	12 46,1%	5 19,2%	1 3,8%	6 23,07%
Neutropenia	26	7 26,9%	0	8 30,7%	6 23,07%	5 19,2%	11 42,3%
Trombocitopenia	25	10 40,0%	3 12,0%	7 28,0%	4 16,0%	1 4,0%	5 20,0%

ES 2 356 308 T3

TABLA 17

Número (%) de pacientes con toxicidad hematológica que recibieron la quimioterapia con Dicarbamine

Tipo de toxicidad	Número de ciclos de QT	Grado de toxicidad hematológica según la OMS					
		0	I	II	III	IV	III+IV
Leucopenia	77 100%	6 7,7%	18 23,3%	43 55,8%	10 12,9%	0	10 12,9%
Neutropenia	67 100%	21 31,3%	12 17,9%	23 34,3%	5 7,4%	6 8,9%	11 16,4%
Trombocitopenia	76 100%	27 35,5%	32 42,1%	10 13,1%	6 7,8%	1 1,3%	7 9,1%

Los datos obtenidos muestran que la toxicidad hematológica limitativa del estadio III-IV sin uso de Dicarbamine (tabla 16) realanza para la leucopenia más del 23,0%, para la neutropenia el 42,3% y para la trombocitopenia el 20,0%.

En el grupo de pacientes que recibieron Dicarbamine la tasa de incidencia de leuco, neutro y trombocitopenia era significativamente inferior (tabla 17). La toxicidad hematológica para la leucopenia disminuyó hasta el 12,9%, es decir 1,8 veces, para la neutropenia 2,6 veces y para la trombocitopenia 2,2 veces. Por tanto, el uso de Dicarbamine dio como resultado la reducción de todas las clases listadas de toxicidad hematológica.

A continuación se presentan los datos que respaldan el hecho de que la administración de Dicarbamine no disminuye la eficacia de la terapia con agentes citostáticos sino que por el contrario potencia en cierta medida el efecto logrado.

Se evaluó la eficacia de la terapia en grupos de pacientes tras dos ciclos de la quimioterapia con o sin Dicarbamine según el esquema descrito anteriormente. Se evaluó la eficacia según los parámetros generalmente aceptados: RC - remisión completa, RP - remisión parcial, SB - estabilización; y Progr. - progresión.

Los datos obtenidos se presentan en la tabla 18.

TABLA 18

Eficacia del tratamiento de pacientes según el esquema de ciclofosfano + carboplatino con Dicarbamine

Grupo de pacientes	Número de pacientes	RC	RP	SB	Progr.
La quimioterapia	6 100,0%	2 33,3%	1 16,6%	2 33,5%	1 16,6%
La quimioterapia + Dicarbamine	15 100,0%	4 26,6%	7 46,6%	2 13,5%	2 13,3%

Los datos presentados muestran que en el grupo de pacientes que recibieron la quimioterapia sin Dicarbamine, el control de crecimiento tumoral (RC+RP) asciende al 49,9%. En el grupo de pacientes que recibieron la quimioterapia con Dicarbamine la eficacia de terapia es del 73,2%.

Por tanto, el uso de Dicarbamine en el tratamiento de pacientes que reciben la quimioterapia da como resultado la reducción de las clases principales de toxicidad hematológica sin disminuir la eficacia de la terapia.

ES 2 356 308 T3

Los datos clínicos y de prueba presentados anteriormente demuestran claramente la eficacia de los derivados peptídicos de fórmula general (I) como inductores no específicos de diferenciación que, cuando se usan derivados peptídicos junto con la quimioterapia mielosupresora, se muestra en la reducción del grado y número de neutropenias y cuando se usa solo da como resultado la estabilización del crecimiento de hemoblastosis murina, de diferenciación de melanoma murino y humano incluyendo el caso de ausencia de eficacia de la quimioterapia.

Se mostró que el efecto de derivados peptídicos de fórmula general (I) sobre el crecimiento tumoral estaba asociado con el retardo de la actividad de proliferación de células tumorales y un grado elevado de diferenciación en particular la capacidad de sintetizar melanina de células de melanoma y la inducción de diferenciación de células precursoras de eritroblastosis por virus de Friend.

Las investigaciones clínicas revelaron las propiedades de derivados peptídicos de fórmula general (I) para disminuir significativamente la toxicidad hematológica en el tratamiento de pacientes con cáncer usando diferentes esquemas de la quimioterapia combinada. Por tanto, cuando se tratan pacientes que padecen cáncer de ovario con preparaciones de platino (ciclofosfano) junto con derivados peptídicos, el grado de trombocitopenia y neutropenia limitativa bajó en 2-3 veces. Al mismo tiempo la eficacia de la terapia no bajó.

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 4.
El efecto de Dicarbamine sobre el crecimiento de melanoma M-6 humano en ratones desnudos

Día después de la inoculación	Control n=7			Dicarbamine 1,5 mg/kg			Dicarbamine 4,5 mg/kg		
	M+m*			M+m			M+m		
	V	%		V	%		V	%	P
Día 18	66,2+2,8	100		21,8+12,8	100		91,9+54,4	100	
Día 25	266,0+69,4	329,0+88,9		77,5+46,4	302,0+186,0	0,82	266,0+198,0	166,0+93,0	0,015
Día 33	582,0+127,4	132,9+57,3		342,0+142,0	428,0+313,1	0,11	852,0+495,0	276,0+104,0	0,011
Día 39	701,0+123,5	21,9+12,6		435,0+187,0	23,2+22,1	0,92	1129,0+600,0	39,8+27,3	0,169
Día 46	778,0+148,4	10,5+8,1		662,0+417,0	23,9+31,0	0,45	1354,0+735,0	19,6+17,5	0,276
Día 53	821,0+221,8	3,8+10,3		783,0+423,0	18,6+54,0	0,43	1550,0+780,0	4,2+22,5	0,538

* - valor promedio con desviación estándar,

** - se realizó el cálculo de la significación sólo para los datos de cambio de porcentaje en volumen del tumor

Tabla 12. Dinámica de la fórmula de leucocitos de sangre periférica de ratones bajo efecto de ciclofosfamida en combinación con Dicarbamine

Elementos Formados		Grupo 1									
Días tras la administración de ciclofosfamida		3	5	7	10	13	17	21			
Mielocitos	0	0	0,4/54±0,4	0	0	0	0	0			
Jóvenes	0	0	1,4/188±148	0,4/48±3	0	0	0	0			
En banda	3,2/89±16	4,6/370±13	4,8/660±223	5,7/620±260	2,2/293±146	1,6/198±150	2,7/286±214				
Segmentado	10,4/290±210	17,6/1400±	31,4/4200±960	27/3200±450	24/3190±440	19,6/2430±545	18,8/2444±585				
Eosinófilos	1,2/34±15	1,2/95,5±44	0	0	1,2/290±73	2,6/322±93	1,4/182±72				
Monocitos	6,2/172±62	7,2/570±17	5,4/724±74	5,2/690±130	4,6/612±219	5,4/60±150	4,0/520±143				
Linfocitos	75,6/2120±310	69,4/5520±	56,2/7530±1250	65,4/7780±450	67,8/9017±580	70,8/8780±545	73,8/9594±585				
Grupo 2											
Mielocitos	0	0,6/26±5	0	0	0	0	0	0			
Jóvenes	0,4/4±1	1,6/70±24	0,6/63±12	0,4/26±5	0	0	0	0			
En banda	1,2/13±3	4,2/184±48	3,6/378±41	3,2/206±71	2,2/268±134	1,6/195±67	1,4/167±67				
Segmentado	5,2/55±0,6	1,6/700±240	35,2/3700±705	23,7/1494±390	18,2/2220±470	20,2/2460±37	19,6/2330±714				
Eosinófilos	0,4/4±1	0,4/17±5	0	1,0/64±35	1,4/170±134	1,4/170±79	1,6/190±130				
Monocitos	4,649±17,5	6,4/280±48	4,8/504±115	5,4/350±160	3,8/464±134	4,4/537±134	4,6/547±65				
Linfocitos	88,2/935±23	71/3110±217	55,8/6860±750	65,8/4240±708	75,0/9150±402	71,6/8740±604	71,6/8520±785				

La tabla presenta %/cantidad absoluta en mm³

Tabla 13.
 Celularidad* de médula ósea murina bajo efecto de ciclofosfamida y ciclofosfamida en combinación con Dicarbamine

Grupo N.º	Días tras la administración de ciclofosfamida						
	3	5	7	10	13	17	21
1	14,5±3,43	21,55±1,92	32,35±3,57	33,8±3,85	32,6±5,22	28,25±3,02	30,4±2,75
2	8,2±1,65	13,05±2,75	25,22±2,75	27,9±2,75	30,15±6,6	25,0±3,16	26,55±4,53

* - número de células en millones

Tabla 14.

El efecto de derivados peptídicos sobre el tamaño del tumor en ratones con eritroblastosis por virus de Friend

Compuesto	Dosis única (mg/kg) en dosificación diaria durante 5 días	Volúmenes promedio del tumor a días tras la finalización de la terapia			% de inhibición del crecimiento tumoral		
		8	13	19			
Control	-	342 [139÷545]	706 [457÷961]	777 [199÷1355]			
1	1,5	157 [73÷241]	284 [197÷371]	318 [136÷500]	54	60*	63
2	1,5	130 [68÷192]	367 [105÷629]	367 [105÷629]	62	48	57
Control**	-	249 [150÷348]	678 [373÷983]	645 [385÷905]	-	-	-
3	1,5**	77 [52÷102]	219 [104÷334]	368 [193÷543]	69*	68*	43
Dicarbamine	1,5	96 [37÷155]	150 [87÷213]	290 [103÷477]	61	78*	55
	4,5**	129 [67÷191]	300 [130÷470]	485 [1354÷835]	62	58	38

Notas: * - la diferencia respecto al control es significativa a $p < 0,05$

** - la segunda prueba

Tabla 15.

El efecto de derivados peptídicos sobre la tasa de crecimiento tumoral en ratones con eritroblastosis por virus de Friend

Compuesto	Dosis única (mg/kg), dosificación diaria durante 5 días	Volúmenes relativos del tumor a días tras la inoculación del tumor junto con la toma diaria de Dicarbamine V_t/V_1		% de inhibición del crecimiento tumoral
		8	19	
Control	-	1,0	2,3	
1	1,5	1,0	2,0	60**
2	1,5	1,0	2,8	48
Control***	1,5	1,0	2,59	-
3	1,5***	1,0	4,78	69**
Dicarbamine	1,5	1,0	3,0	78**
	4,5***	1,0	3,76	58

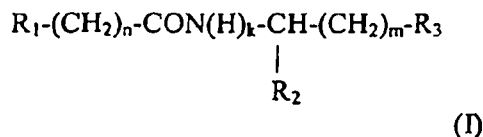
Notas: * - $p < 0,05$

** - la segunda prueba

REIVINDICACIONES

1. Derivado peptídico de fórmula general

5



10

en la que:

15

- n=0-4, m=1-4, k=0-1;

- R₁ es un radical hidrocarbonado C₁-C₃ sustituido con un grupo funcional seleccionado de grupos carboxílico, amido C₁-C₅ o amino, estando el grupo carboxílico opcionalmente esterificado; o

20

- R₁ es un radical hidrocarbonado C₁-C₃ sustituido simultáneamente con (a) un grupo amino que está opcionalmente sustituido con un sustituyente acilo y (b) un grupo carboxílico; o

25

- R₁ es un radical hidrocarbonado C₁-C₃ sustituido con un grupo heterocíclico insaturado de 5-6 miembros, en el que el radical hidrocarbonado puede comprender simultáneamente un grupo amino opcionalmente sustituido con un sustituyente acilo; o

- R₁ es un grupo heterocíclico saturado;

30

- R₂ es átomo de hidrógeno o un grupo funcional seleccionado de carboxilo, que puede estar esterificado;

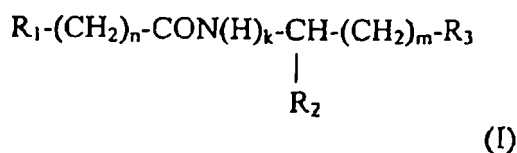
- R₃ es un grupo heterocíclico o cíclico saturado o insaturado de 5-6 miembros, o un grupo carboxilo o amino, estando el grupo carboxilo opcionalmente esterificado;

35

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de hemoblastosis o melanoma.

2. Derivado peptídico de fórmula general

40



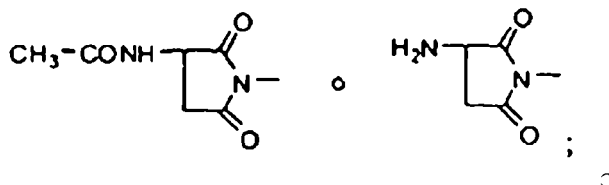
45

en la que:

50

- n es 0, k es 0 y R₁-CON- es

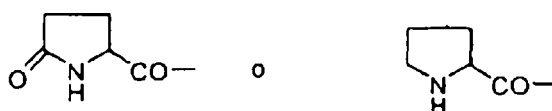
55



60

- n es 0, k es 1 y R₁-CO- es

65

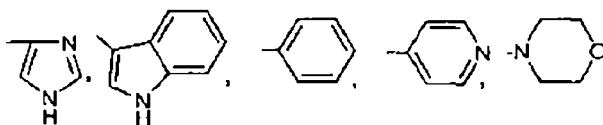


ES 2 356 308 T3

- R₂ es H, COOH o COOCH₃;

- R₃ es

5



10

NH₂, -COOH o -COOCH₃; y

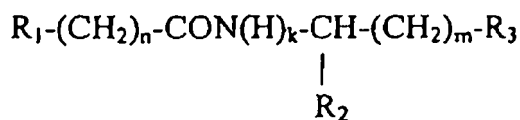
15

- m es 1-4,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de hemoblastosis o melanoma.

20

3. Derivado peptídico de fórmula general (I)



25

en la que R₁, n, k, R₂, m y R₃ son tal como se definen en la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de neutropenia provocada por terapia mielosupresora.

30

4. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que

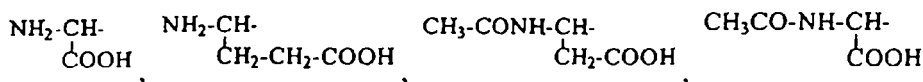
35

n = 0-4,

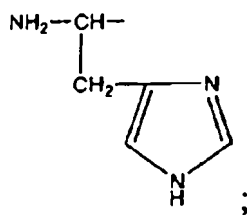
k = 0-1,

R₁ = NH₂CH₂-, HOOC-CH₂-, CH₃CONH-CH₂-, CH₃OCO-CH₂-,

40



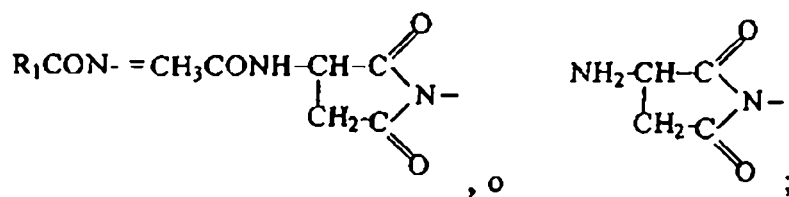
45



50

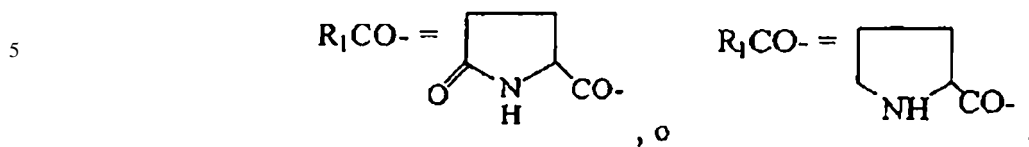
o, cuando n es 0 y k es 0,

55

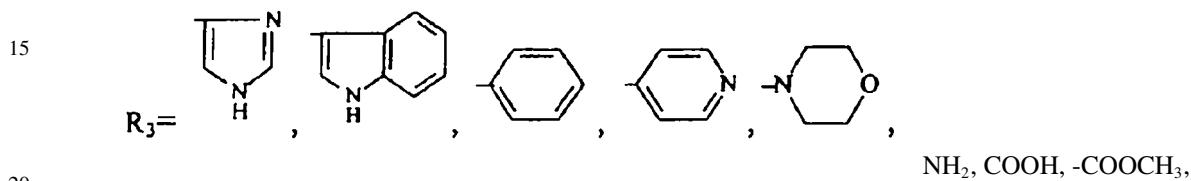


65

o, cuando n es 0 y k es 1,

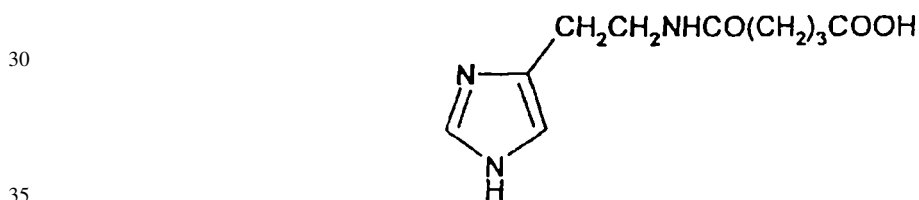


10 $R_2=H, COOH, COOCH_3;$



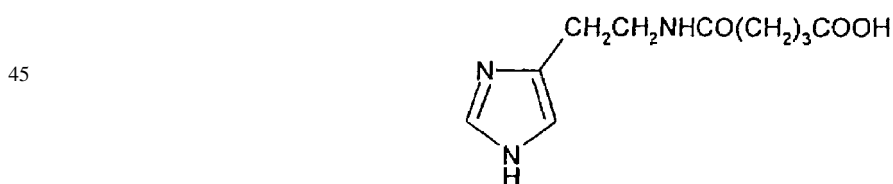
y m=1-4.

25 5. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado peptídico es un compuesto de fórmula



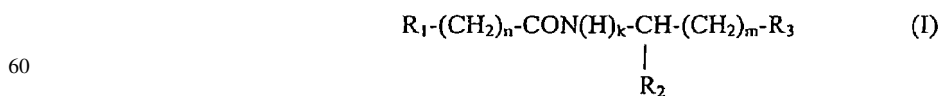
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 6. Derivado peptídico según la reivindicación 3, que tiene la fórmula






o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de neutropenia y trombocitopenia provocada por quimioterapia.

55 7. Derivado peptídico de fórmula general (I),


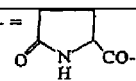
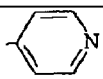
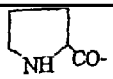
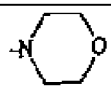


65 en la que R_1, n, k, R_2, m y R_3 son tal como se definen a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la reducción de neutropenia provocada por quimioterapia mielosupresora,

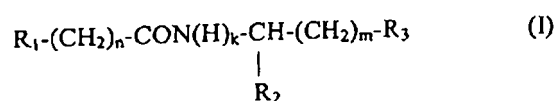
ES 2 356 308 T3

Número de compuesto	R ₁	n	K	R ₂	m	R ₃
1	$\text{NH}_2\text{-CH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COOH}$	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
3	HOOC-CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
4	$\text{NH}_2\text{-CH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COOH}$	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	$\text{NH}_2\text{-CH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
6	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
7	HOOC-CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
8	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
9	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
11	NH ₂ -CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
12	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
13	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	$\text{CH}_3\text{-CONH-CH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
15	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{CH}_2\text{CONH-CH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N-}$ 	0	0	H	1	-4-Im
16	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{NH}_2\text{-CH-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N-}$ 	0	0	H	1	-4-Im
17	CH ₃ CONH-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im

ES 2 356 308 T3



18	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-}$	1	1	H	1	-4-Im
19	$\text{CH}_3\text{OCO-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-4-Im
20	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-}$	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)
21	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{-}$	0	1	H	1	-3-Ind
22	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-3-Ind
23	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	1	-3-Ind
24	$\text{R}_1\text{CO-}$ 	0	1	H	1	-3-Ind
25	$\text{COOH-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-3-Ind
26	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-}$	2	1	H	1	-3-Ind
27	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-C ₆ H ₅
28	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	 (-Py)
29	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-}$	2	1	H	1	-Py
30	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	-Py
31	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	-COOH	4	-NH ₂
32	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-4Im})\text{-}$	0	1	H	1	-COOH
33	$\text{R}_1\text{CO-}$ 	0	1	H	1	-4-Im
34	$\text{HOOC-CH}_2\text{-}$	2	1	H	1	
35	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-4Im})\text{-}$	0	1	H	1	-COOCH ₃
36	$\text{CH}_3\text{CO-NH-CH}(\text{COOH})\text{-}$	2	1	H	1	-4-Im
37	$\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2\text{-}$	1	1	-COOH	1	-4-Im
38	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4	1	H	1	-4-Im

8. Derivado peptídico para su uso según la reivindicación 1 ó 2, que tiene la fórmula general (I),


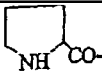



en la que R₁, n, k, R₂, m y R₃ son tal como se definen a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de hemoblastosis o melanoma, en combinación con interferón, para potenciar la eficacia de la inmunoterapia,

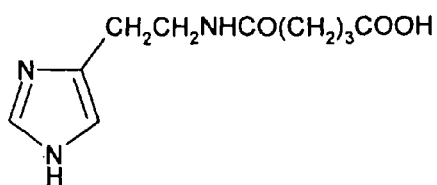
ES 2 356 308 T3

Número de compuesto	R	n	K	R	m	R
1	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	HOOC-CH -	2	1	H	1	-4-Im
3	HOOC-CH -	1	1	H	1	-4-Im
4	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
6	HOOC-CH -	2	1	-COOCH.	1	-4-Im
7	HOOC-CH -	1	1	-COOH	1	-4-Im
9	NH -CH -	2	1	-COOCH.	1	-4-Im
11	NH -CH -	1	1	H	1	-4-Im
12	NH -CH -	2	1	H	1	-4-Im
13	HOOC-CH -	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	$\text{CH}_3\text{-CONH-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-4-Im
15	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{CH}_2\text{CONH-CH-C}$ $\text{CH}_2\text{-C}$	0	0	H	1	-4-Im
16	$\text{R}_1\text{CON-}=\text{NH}_2\text{-CH-C}$ $\text{CH}_2\text{-C}$	0	0	H	1	-4-Im
17	CH.CONH-CH -	2	1	H	1	-4-Im
18	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	1	1	H	1	-4-Im
19	CH.OCO-CH -	2	1	H	1	-4-Im
20	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)
21	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	0	1	H	1	-3-Ind
22	HOOC-CH -	2	1	-COOH	1	-3-Ind
23	NH -CH -	2	1	-COOH	1	-3-Ind
24	$\text{R}_1\text{CO-}=\text{N}$ O H CO-	0	1	H	1	-3-Ind
25	COOH-CH -	2	1	H	1	-3-Ind
26	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-3-Ind
27	NH -CH -	2	1	H	1	-C.H.

ES 2 356 308 T3

28	NH -CH -	2	1	H	1	 (-Py)
29	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-Py
30	HOOC-CH -	2	1	H	1	-Py
31	HOOC-CH -	2	1	-COOH	4	-NH
32	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-4Im}$	0	1	H	1	-COOH
33	$\text{R}_1\text{CO-}$ = 	0	1	H	1	-4-Im
34	HOOC-CH -	2	1	H	1	
35	$\text{NH}_2\text{-CH-}$ $\text{CH}_2\text{-4Im}$	0	1	H	1	-COOCH
36	$\text{CH}_3\text{CO-NH-CH-}$ COOH	2	1	H	1	-4-Im
37	CH CONH-CH -	1	1	-COOH	1	-4-Im
38	NH -CH -	4	1	H	1	-4-Im

9. Derivado peptídico de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inmunoterapia contra tumores malignos, en combinación con interferón, para mejorar la eficacia de la inmunoterapia.