

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 214**

51 Int. Cl.:
A61K 38/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03755357 .5**
96 Fecha de presentación: **09.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1507554**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2005**

54 Título: **LACTOFERRINA EN EL TRATAMIENTO DE NEOPLASMAS MALIGNOS Y DE OTRAS ENFERMEDADES HIPERPROLIFERATIVAS.**

30 Prioridad:
10.05.2002 US 379441 P
10.05.2002 US 379442 P
10.05.2002 US 379474 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

73 Titular/es:
AGENIX INCORPORATED
8 GREENWAY PLAZA, SUITE 910
HOUSTON, TX 77046, US

72 Inventor/es:
VARADHACHARY, Atul; BARSKY, Rick;
PERICLE, Frederica; PETRAK, Karel y
WANG, Yenyun

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 368 214 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

Lactoferrina en el tratamiento de neoplasmas malignos y de otras enfermedades hiperproliferativas.

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/379.442 presentada el 10 de mayo del 2002; Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/379.441 presentada el 10 de mayo del 2002 y Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/379.474 presentada el 10 de mayo del 2002.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa por administración de una composición de lactoferrina sola o en combinación con terapias anticancerosas convencionales. La composición de lactoferrina se administra por vía oral.

15 **Antecedentes de la invención**

Actualmente, existen pocas opciones eficaces para el tratamiento de muchos tipos de cánceres comunes. La evolución del tratamiento para un individuo determinado depende del diagnóstico, de la etapa en la cual se ha desarrollado la enfermedad y de factores tales como la edad, el sexo y la salud general del paciente. Las opciones más convencionales de tratamiento contra el cáncer incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía desempeña un papel principal en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Típicamente se requiere una estrategia quirúrgica para realizar biopsias y la extracción de crecimiento canceroso. Sin embargo, si el cáncer se ha metastasizado y está extendido, es improbable que la cirugía de como resultado una cura y debe tomarse una estrategia alternativa. Los efectos secundarios de la cirugía incluyen disminución de la función estructural u orgánica y aumento del riesgo de infección, hemorragia o complicaciones relacionadas con la coagulación. La radioterapia, quimioterapia, bioterapia e inmunoterapia son alternativas al tratamiento quirúrgico del cáncer (Mayer, 1998; Ohara, 1998; Ho *et al.*, 1998). La desventaja de muchas de las terapias alternativas son los efectos secundarios, que pueden incluir, mielosupresión, irritación de piel, dificultad de deglución, xerostomía, náuseas, diarrea, alopecia, pérdida de peso y pérdida de energía (Curran, 1998; Brizel, 1998).

La lactoferrina es una glucoproteína monocatenaria que se une a metales. Se sabe que muchos tipos de células, tales como monocitos, macrófagos, linfocitos y células de las microvellosidades intestinales, poseen receptores de lactoferrina. La lactoferrina, además de ser un factor de crecimiento esencial para linfocitos T y B, presenta una amplia diversidad de funciones relacionadas con los mecanismos de defensa primarios del hospedador. Por ejemplo, se ha descrito que la lactoferrina activa a los linfocitos citolíticos naturales (NK, de las siglas en inglés *Natural Killer*), inducen la actividad estimuladora de colonias, activa a neutrófilos polimorfonucleares (NPM), regula la granulopoyesis, potencia la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, estimula la actividad de los linfocitos citolíticos activados por linfocinas (LAK, de las siglas en inglés *Lymphokine-Activated Killer*) y potencia la toxicidad frente a macrófagos.

Recientemente, se ha usado lactoferrina bovina (bLF) como una profilaxis para la formación de tumores y/u otros tumores establecidos. La presente invención es la primera que usa lactoferrina como un tratamiento, no como una profilaxis, para tumores establecidos.

45 **Breve resumen de la invención**

La presente invención se refiere a la lactoferrina humana para su uso en un método para reducir el crecimiento de, o disminuir, un neoplasma establecido, administrando por vía oral a un sujeto, que padece un neoplasma establecido, lactoferrina humana, en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento de, o disminuir, el neoplasma en dicho sujeto.

La invención también proporciona:

- un agente quimioterapéutico para su uso en el método definido en el presente documento en combinación con lactoferrina humana administrada por vía oral;
- 55 - un antiácido para su uso en el método definido en el presente documento en combinación con lactoferrina humana administrada por vía oral;
- el uso de lactoferrina humana para la preparación de una composición para reducir el crecimiento de, o disminuir, un neoplasma establecido administrando la composición por vía oral a un sujeto que padece un neoplasma establecido en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento de, o disminuir, el neoplasma establecido;
- 60 - el uso de un agente quimioterapéutico para la preparación de una composición para reducir el crecimiento de, o disminuir, un neoplasma establecido en combinación con lactoferrina humana administrada por vía oral; y
- el uso de un antiácido para la preparación de una composición para reducir el crecimiento de, o disminuir, un neoplasma establecido en combinación con lactoferrina humana administrada por vía oral.

65 La presente invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de administrar por vía oral a un sujeto humano una composición de lactoferrina en una cantidad

suficiente para proporcionar en el sujeto una mejora en la enfermedad hiperproliferativa. Más específicamente, la cantidad de la composición que se administrará es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 g al día, más preferiblemente de 20 mg a aproximadamente 10 g al día. Una realización adicional se refiere a la administración de un antiácido junto con la composición de lactoferrina humana.

5 En realizaciones específicas, la composición de lactoferrina humana se dispersa en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la lactoferrina humana es lactoferrina humana recombinante.

10 La enfermedad hiperproliferativa se define adicionalmente como cáncer, en el que el cáncer comprende un neoplasma. El neoplasma se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, hepatocarcinoma pulmonar, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, leucemia, neuroblastoma, cáncer de células escamosas, de cabeza, de cuello, de encía, de lengua, de mama, de páncreas, de próstata, renal, óseo, testicular, ovárico, mesotelioma, sarcoma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebral, de colon y de vejiga. Más específicamente, el neoplasma es un neoplasma hematopoyético. Por ejemplo, el neoplasma hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, síndrome mielodisplásico, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, mieloma múltiple y leucemia linfocítica crónica.

20 En otras realizaciones, la enfermedad hiperproliferativa se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, reestenosis, aterosclerosis, lesiones pre-neoplásicas, carcinoma in situ, leucoplasia vellosa oral y soriasis.

25 Otra realización se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de complementar el sistema inmunitario de la mucosa en un sujeto aumentando la cantidad de lactoferrina humana en el tracto gastrointestinal. La lactoferrina humana se administra por vía oral y estimula la producción de interleucina-18 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor).

30 Aún adicionalmente, otra invención se refiere a un método para potenciar una respuesta inmunitaria en la mucosa en el tracto gastrointestinal en un sujeto que comprende la etapa de administrar por vía oral al sujeto una lactoferrina humana. La lactoferrina humana estimula la interleucina-18 y el GM-CSF en el tracto gastrointestinal. La IL-18 estimula la producción, maduración, migración o actividad de células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T o linfocitos citolíticos. Los linfocitos T se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos CD4+, CD8+ y CD3+. El GM-CSF también estimula la producción, maduración, migración o actividad de células inmunes, por ejemplo células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos. Una realización adicional se refiere al tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende administrar por vía oral a un sujeto una composición de lactoferrina humana en combinación con quimioterapia, bioterapia, inmunoterapia, cirugía o radioterapia. Más particularmente, la quimioterapia es una quimioterapia basada en platino, tal como cisplatino, o una quimioterapia basada en taxano, tal como docetaxel.

40 La invención se refiere a un método para reducir el crecimiento de un neoplasma en un sujeto y que comprende la etapa de administrar, por vía oral al sujeto, una composición de lactoferrina humana en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento del neoplasma en el sujeto. Aún adicionalmente, la composición de lactoferrina puede administrarse en combinación con quimioterapia, bioterapia, inmunoterapia, cirugía o radioterapia.

45 También se describe un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de administrar, por vía intravenosa a un sujeto, una composición de lactoferrina en una cantidad suficiente para proporcionar una mejora en la enfermedad hiperproliferativa. La cantidad de la composición que se administra es de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10 g al día. Más particularmente, la lactoferrina es lactoferrina de mamífero, por ejemplo, humana o bovina, y la lactoferrina puede ser lactoferrina recombinante.

50 También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de complementar un sistema inmunitario sistémico en un sujeto aumentando la cantidad de lactoferrina en la circulación sistémica. La lactoferrina se administra por vía intravenosa. Aún adicionalmente, la composición de lactoferrina se administra en combinación con quimioterapia, bioterapia, inmunoterapia, cirugía o radioterapia.

55 También se describe un método para potenciar una respuesta inmunitaria sistémica después de la etapa de administrar por vía intravenosa a un sujeto una composición de lactoferrina. La lactoferrina estimula la interleucina-18 y el GM-CSF. Se contempla que la interleucina-18 estimula la producción o actividad de células inmunitarias, por ejemplo linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales, y el GM-CSF promueve la migración y maduración de células inmunitarias incluyendo células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos.

60 También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de administrar por vía tópica o un sujeto una composición de lactoferrina en una cantidad suficiente para proporcionar una mejora en la enfermedad hiperproliferativa. La cantidad de la composición que se administra es de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10 g al día. La composición puede ser un gel tópico, una solución,

cápsula o un comprimido que tiene una concentración de lactoferrina de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 20%. Más particularmente, la lactoferrina es lactoferrina de mamífero, por ejemplo, humana o bovina, y la lactoferrina puede ser lactoferrina recombinante.

5 También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa por administración tópica de una composición de lactoferrina en combinación con quimioterapia, bioterapia, inmunoterapia, cirugía o radioterapia.

10 También se describe un método para potenciar una respuesta inmunitaria sistémica o local después de la etapa de administrar por vía tópica al sujeto una composición de lactoferrina. La lactoferrina estimula la producción de interleucina-18 y/o del GM-CSF por los queratinocitos. Se contempla que la interleucina-18 estimula la producción o actividad de células inmunitarias, por ejemplo linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales y el GM-CSF promueve la migración y maduración de células inmunitarias incluyendo células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos.

15 También se describe un método de estimulación, potenciación o regulación positiva de interleucina-18 y/o del GM-CSF administrando a un sujeto una composición de lactoferrina.

20 Lo citado anteriormente ha descrito bastante ampliamente las características y ventajas técnicas de la presente invención para un mejor entendimiento de la descripción detallada de la invención que se describe a continuación. En lo sucesivo, en el presente documento, se describirán características y ventajas adicionales de la invención que constituyen el objeto de las reivindicaciones de la presente invención. Los expertos en la materia apreciarán que el diseño y las realizaciones específicas descritas pueden utilizarse fácilmente como una base para modificar o diseñar otras estructuras para realizar los mismos fines de la presente invención. Comprenderán también los expertos en la materia que dichas construcciones equivalentes no se alejan del ámbito de la invención tal y como se indica en las reivindicaciones adjuntas. Las nuevas características, que se piensa que son características de la presente invención, tanto como por su organización como por su método operativo, junto con aspectos y ventajas adicionales, se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considera junto con las figuras adjuntas. Sin embargo, debe entenderse expresamente que, cada una de las figuras, se proporciona únicamente con fines ilustrativos y descriptivos y no se han previsto como una definición de los límites de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

35 Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones consideradas en conjunto con los dibujos adjuntos.

La FIG. 1 muestra el crecimiento tumoral de células escamosas con y sin administración oral, intravenosa e intratumoral de lactoferrina humana recombinante.

40 La FIG. 2 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral en animales a los que se les ha administrado lactoferrina, cisplatino y lactoferrina en combinación con cisplatino.

La FIG. 3 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral con lactoferrina en combinación con diversas dosis de cisplatino.

La FIG. 4 muestra la actividad de NK después del tratamiento con lactoferrina.

45 La FIG. 5 muestra crecimiento tumoral de células escamosas con y sin administración intratumoral de lactoferrina recombinante una vez o dos veces al día.

Descripción detallada de la invención

50 Para un experto en la materia es fácilmente obvio que, en la invención descrita en esta memoria descriptiva, puedan realizarse diversas realizaciones y modificaciones sin alejarse del ámbito de la invención.

55 Como se usa en el presente documento, el uso de la palabra “uno” o “una”, cuando se usa junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar “uno”, “una” pero también es consecuente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

La expresión “enfermedad hiperproliferativa”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento tisular normal. Por tanto, una célula hiperproliferativa es una célula que prolifera más rápidamente que las células normales.

60 La expresión “administración parenteral”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier forma de administración en la que el compuesto se absorbe dentro del sujeto sin implicar absorción mediante el intestino. Las administraciones parenterales ejemplares que se describen incluyen, administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intraocular o intraarticular.

65 La expresión “administración intravenosa”, como se usa en el presente documento, incluye todas las técnicas para administrar una composición de lactoferrina en la circulación sistémica mediante una inyección o infusión

intravenosa.

5 La expresión “administración intratumoral”, como se usa en el presente documento, incluye todas las técnicas para administrar una composición de lactoferrina en el lugar de un tumor incluyendo inyección, electroporación, cremas, lociones u otras formas de administración.

La expresión “administración oral”, como se usa en el presente documento, incluye administración oral, bucal, enteral o intragástrica.

10 La expresión “administración tópica”, como se usa en el presente documento, incluye la aplicación a una superficie dérmica, epidérmica, subcutánea o mucosa.

15 La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea compatible con los vectores o células de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. En las composiciones también puede incorporarse ingredientes complementariamente activos.

20 El término lactoferrina “o LF”, como se usa en el presente documento, se refiere a lactoferrina natural o recombinante. La lactoferrina natural puede obtenerse por purificación de leche o calostro de mamífero o de otras fuentes naturales. La lactoferrina recombinante (rLF) puede prepararse por expresión recombinante o por producción directa en animales, plantas, hongos, bacterias u otras especies procariontas o eucariotas modificadas genéticamente, o mediante síntesis química.

25 El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sujeto mamífero en el que la composición de lactoferrina se administra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En una realización específica, los métodos se emplean para tratar un sujeto humano. También se describe el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad hiperproliferativa.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que produce una mejora o remedio de los síntomas de la enfermedad o afección.

35 El término “tratando” y “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de lactoferrina de manera que el sujeto tenga una mejora en la enfermedad. La mejora es cualquier mejora o remedio de los síntomas. La mejora es una mejora observable o medible. Por tanto, un experto en la materia comprende que un tratamiento puede mejorar la patología, pero puede no ser una cura completa para la enfermedad. Específicamente, las mejoras en pacientes con cáncer pueden incluir estabilización del tumor, disminución del tumor, aumento del tiempo de avance, aumento de supervivencia o mejoras en la calidad de vida. También pueden reflejarse efectos beneficiosos en una mejora del sistema inmunitario del paciente, medida por la cantidad y actividad de células inmunitarias circulantes, tales como, linfocitos CD4+, CD8+, linfocitos NK y linfocitos CD40+.

45 El término “cerca”, como se usa en el presente documento, se refiere a en el área o alrededor del área o sitio del tumor y/o enfermedad hiperproliferativa. Por ejemplo, “cerca de un tumor” puede referirse al área en el tumor o alrededor del tumor o márgenes del tumor. El término cerca incluye el área adyacente al tumor, el área sobre el tumor, el área por debajo del tumor, el área marginal alrededor del tumor o el área adyacente al área marginal del tumor.

50 **A. Composiciones Farmacéuticas**

La lactoferrina usada de acuerdo con la presente invención puede obtenerse mediante aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales, por ejemplo, pero sin limitación, leche de mamíferos. La lactoferrina es lactoferrina humana. En realizaciones preferidas, la lactoferrina es lactoferrina humana producida de manera recombinante usando técnicas de modificación por ingeniería genética bien conocidas y usadas en la técnica, tales como expresión recombinante o producción directa en animales, plantas o eucariotas genéticamente modificados, o síntesis química. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.571.896; 5.571.697 y 5.571.691.

60 La administración de las composiciones de lactoferrina de acuerdo con la presente invención es oral. Dichas composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables como se descubre en el presente documento.

65 Las composiciones de la presente invención pueden formularse en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos

orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico o similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

5 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la lactoferrina en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con el resto de los diversos ingredientes indicados anteriormente, si fuera necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones
10 inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Adicionalmente de acuerdo con la presente invención, la composición de lactoferrina para administración oral se
15 proporciona típicamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable o digerible e incluye vehículos líquidos, semisólidos, es decir, concentrados o sólidos. Salvo en el caso en el que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial hacia el receptor o hacia la eficacia terapéutica de una preparación de lactoferrina contenida en su interior, su uso es apropiado en una lactoferrina administrable por vía oral para su uso en la realización práctica de los métodos de la presente invención.
20 Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, la lactoferrina se combina con el vehículo de cualquier manera práctica y conveniente, es decir, por solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, microencapsulación,
25 absorción y similares. Dichos procedimientos son rutinarios para los expertos en la materia.

En una realización específica de la presente invención, la lactoferrina en forma de polvo se combina o se mezcla totalmente con un vehículo semisólido o sólido. La mezcla puede realizarse de cualquier manera conveniente tal como por molienda. En el proceso de mezcla también pueden añadirse agentes estabilizantes para proteger a la
30 composición de la pérdida de actividad terapéutica, por ejemplo, por desnaturalización en el estómago. Entre los ejemplos de estabilizantes para su uso en una composición administrable por vía oral se incluyen tampones, antagonistas de la secreción de ácidos en el estómago, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc., inhibidores de enzimas proteolíticas y similares. Más preferiblemente, para una composición administrada por vía oral, el
35 estabilizante también puede incluir antagonistas contra la secreción de ácidos en el estómago.

Adicionalmente, la lactoferrina para administración oral que se combina con un vehículo semisólido o sólido puede formularse adicionalmente en cápsulas de gelatina de carcasa dura o blanda, comprimidos o píldoras. Más preferiblemente, las cápsulas de gelatina, los comprimidos o píldoras se recubren con un recubrimiento entérico. Los
40 recubrimientos entéricos impiden la desnaturalización de la composición en el estómago o en la parte superior del intestino donde el que el pH es ácido. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.629.001. Después de alcanzar el intestino delgado, el pH básico en su interior disuelve el recubrimiento y permite que la composición se libere y que las células especializadas, es decir, células M de enterocitos epiteliales y de la placa de Peyer, la absorban.

En otra realización, se combina una composición en polvo con un vehículo líquido tal como, por ejemplo, agua o una solución salina con o sin un agente estabilizante.

Una formulación específica que puede usarse es una solución de lactoferrina en un tapón basado en fosfato hipotónico sin potasio en el que la composición del tampón es la siguiente: fosfato de sodio monobásico monohidrato 6 mM, fosfato sódico dibásico heptahidrato 9 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH $7,0 \pm 0,1$. La concentración de lactoferrina en un tampón hipotónico puede variar de 10 microgramos/ml a 100 miligramos/ml. Esta formulación puede administrarse mediante cualquier vía de administración, por ejemplo, administración intratumoral.

Adicionalmente, en una pomada en gel puede formularse además una composición para administración tópica que se combine con un vehículo semisólido. Un vehículo preferido para la formación de una pomada en gel es un polímero en gel. Los polímeros preferidos que se usan para preparar una composición en gel incluyen, pero sin limitación, carbopol, carboximetilcelulosa y polímeros plurónicos. Específicamente, para la aplicación en la piel o debajo de la piel, para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, se combina una composición de
60 lactoferrina en polvo con un gel acuoso que contiene un agente de polimerización tal como Carbopol 980 a una fuerza entre el 0,5% y el 5% en peso/volumen.

Después de la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz para producir una mejora o remedio de los
65 síntomas. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación tales como soluciones ingeribles, cápsulas liberadoras de fármaco y similares. Dependiendo de la afección del sujeto a tratar,

puede producirse cierta variación en la dosificación. La persona responsable de la administración puede, en cualquier caso, determinar la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración en seres humanos, las preparaciones cumplen con las normas de esterilidad, seguridad y pureza generales exigidas por la Office of Biologics standards de la FDA

5

B. Tratamiento de Enfermedades Hiperproliferativas

De acuerdo con la presente invención, una composición de lactoferrina, proporcionada en cualquiera de los vehículos farmacéuticos descritos anteriormente, puede administrarse a un sujeto que padece un neoplasma estabilizado. Un experto en la materia puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de lactoferrina humana que debe administrar a un sujeto basándose en diversas cuestiones, tales como absorción, metabolismo, método de administración, edad, peso, gravedad de la enfermedad y respuesta a la terapia.

10

La vía de administración es la administración oral.

15

La administración oral de la composición de lactoferrina incluye administración oral, bucal, enteral o intragástrica. También se contempla que la composición pueda usarse como un aditivo en el alimento. Por ejemplo, la composición se espolvorea en el alimento o se añade a un líquido antes de la ingestión.

20

25

Un neoplasma es un crecimiento tisular anómalo, que generalmente forma una masa distinguible que crece por proliferación celular más rápidamente a como lo hace el crecimiento tisular normal. Los neoplasmas muestran carencia parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Estos pueden clasificarse ampliamente en tres tipos principales. Los neoplasmas malignos que se originan de estructuras epiteliales se denominan carcinomas, los neoplasmas malignos que se originan de tejidos conectivos, tales como músculo, cartílago, grasa o hueso, se denominan sarcomas y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras que pertenecen a la formación de células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmunitario, se denominan leucemias, linfomas y mielomas. Un tumor es el crecimiento neoplásico de la enfermedad del cáncer. Como se usa en el presente documento, un "neoplasma", denominado también "tumor" pretende incluir neoplasmas hematopoyéticos así como neoplasmas sólidos. Entre los ejemplos de neoplasmas se incluyen, pero sin limitación, melanoma, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar, hepatocarcinoma, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, cáncer de encía, de lengua, leucemia, neuroblastoma, cáncer de cabeza, de cuello, de mama, de páncreas, de próstata, renal, óseo, testicular, ovárico, mesotelioma, sarcoma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebral, de colon, de vejiga, mieloma u otros neoplasmas malignos o benignos.

30

35

Otras enfermedades hiperproliferativas incluyen, neurofibromatosis, artritis reumatoide, granulomatosis de Waginer, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso, granuloma anular, enfermedad inflamatoria intestinal, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis, lesiones pre-neoplásicas, carcinoma in situ, leucoplasia vellosa oral, o soriasis y pre-leucemias, anemia con abundantes blastos y síndrome mielodisplásico.

40

Los neoplasmas de interés particular en la presente invención incluyen, pero sin limitación, neoplasmas hematopoyéticos. Por ejemplo, un neoplasma hematopoyético puede incluir leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, síndrome mielodisplásico, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica u otra malignidad de origen hematológico.

45

En la presente invención, las composiciones de lactoferrina están destinadas para administrarse en una cantidad eficaz para disminuir, reducir, inhibir o suprimir el crecimiento de un tumor. La cantidad puede variar de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 100 g de la composición de lactoferrina. Preferiblemente, la composición de lactoferrina se administra por vía oral en el intervalo de 1 mg a 10 g al día, más preferiblemente de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 10 g al día siendo la dosis más preferida de 4,5 g al día. Preferiblemente, la solución, cápsula o comprimido comprende una concentración de lactoferrina de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%. Más preferiblemente, la solución, cápsula o comprimido puede comprender una concentración de lactoferrina de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 8,5%.

50

55

Los regímenes de tratamiento también pueden variar, y con frecuencia dependen del tipo de tumor, de la localización del tumor, del avance de la enfermedad y de la salud y edad del paciente. Evidentemente, determinados tipos de tumor requerirán un tratamiento más agresivo, mientras que al mismo tiempo, determinados pacientes no pueden tolerar protocolos muy exigentes. El médico será el más adecuado para tomar dichas decisiones basándose en la eficacia y toxicidad conocidas (si hubiera) de las formulaciones terapéuticas.

60

En algunas realizaciones, el tumor a tratar puede, al menos inicialmente, ser no resecable. Los tratamientos con la composición de lactoferrina pueden aumentar la resecabilidad del tumor debido a una contracción en los bordes o por eliminación de determinadas partes particularmente invasivas. Después de los tratamientos, puede ser posible la resección. Los tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán para eliminar la enfermedad residual microscópica en el lugar del tumor.

65

La presente invención puede usarse en el momento de la cirugía y/o después de la misma, para tratar la enfermedad residual o metastásica. Por ejemplo, a un tumor resecado se le puede inyectar o perfundir una formulación que comprenda la composición de lactoferrina. La perfusión puede ser una post-resección continuada, por ejemplo, dejando un catéter implantado en el lugar de la cirugía. También se contempla tratamiento post-quirúrgico periódico.

La administración continua también puede aplicarse, cuando sea apropiado, por ejemplo, cuando se extirpa un tumor y el lecho del tumor se trata para eliminar la enfermedad residual, microscópica. Se prefiere la administración mediante jeringa o cateterización. Dicha perfusión continua puede tener realizarse durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1-2 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o más después del inicio del tratamiento. Generalmente, la dosis de la composición terapéutica mediante perfusión continua será equivalente a la proporcionada mediante una sola inyección o inyecciones múltiples, reguladas a lo largo de un periodo de tiempo durante el cual se produce la perfusión. Adicionalmente se consideró que podía usarse la perfusión en miembros para administrar las composiciones terapéuticas, particularmente en el tratamiento de melanomas y sarcomas.

En realizaciones específicas, la composición de lactoferrina puede proporcionarse en una sola dosis o en dosis múltiples. La dosis única puede administrarse diariamente, o varias veces al día, o varias veces a la semana, o mensualmente o varias veces al mes. En una realización adicional, la composición de lactoferrina puede proporcionarse en una serie de dosis. La serie de dosis puede administrarse diariamente, o varias veces al día, semanalmente, o varias veces a la semana, o mensualmente o varias veces al mes.

En el presente documento se describe un método de tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de complementar un sistema inmunitario en la mucosa aumentando la cantidad de lactoferrina en el tracto gastrointestinal. Preferiblemente, la lactoferrina se administra por vía oral.

También se describe un método para potenciar en un sujeto una respuesta inmunitaria en la mucosa en el tracto gastrointestinal que comprende la etapa de administrar, por vía oral, a dicho sujeto una composición de lactoferrina, preferiblemente lactoferrina humana. Se contempla que la lactoferrina estimula la interleucina-18 y el GM-CSF en el tracto gastrointestinal, lo que potencia las células inmunitarias. Por ejemplo, la interleucina-18 potencia los linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales y el GM-CSF promueve la maduración y migración de células inmunitarias, incluyendo células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. En realizaciones específicas, la interleucina-18 (IL-18) potencia linfocitos CD4+, CD8+ y CD3+. Los expertos en la materia saben que la IL-18 es una citocina Th1 que actúa en sinergia con la interleucina-12 y la interleucina-2 en la estimulación de la producción de IFN-gamma en los linfocitos. También pueden potenciarse otras citocinas, por ejemplo, pero sin limitación IL-1 b o IL-12 o IFN-gamma. También se contempla que la lactoferrina estimule la interleucina-18 después de administración oral, lo que inhibe la angiogénesis y por lo tanto tiene actividad contra células tumorales que dependen de neovascularización.

También se describe un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de complementar el sistema inmunitario sistémico aumentando la cantidad de lactoferrina en la circulación sistémica. Preferiblemente, la composición de lactoferrina se administra por vía intravenosa. Se contempla que la lactoferrina estimula la interleucina-18 y el GM-CSF en el tejido, lo que potencia las células inmunes. Por ejemplo, la interleucina-18 potencia a los linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales y el GM-CSF promueve la maduración y migración de células inmunitarias, incluyendo células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. En realizaciones específicas, la interleucina-18 (IL-18) potencia los linfocitos CD4+, CD8+ y CD3+. Los expertos en la materia saben que la IL-18 es una citocina Th1 que actúa en sinergia con la interleucina-12 e interleucina-2 en la estimulación de la producción IFN-gamma en los linfocitos. También pueden potenciarse otras citocinas por ejemplo, pero sin limitación, IL-1 b o IL-12 o IFN-gamma. También se contempla que la lactoferrina estimule la interleucina-18 después de administración intravenosa lo que inhibe la angiogénesis y por lo tanto tiene actividad contra células tumorales que dependen de neovascularización.

También se describe un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de complementar un sistema inmunitario local o sistémico aumentando la cantidad de lactoferrina cerca del tumor. Cerca del tumor se refiere al área general del tumor, por ejemplo la lactoferrina puede administrarse directamente en el tumor o sobre el tumor, o en el área general del tumor, pero no directamente dentro el tumor. El área general puede incluir el marginal o cerca o adyacente al área marginal del tumor. Preferiblemente, la composición de lactoferrina se administra por vía intratumoral. Se contempla que la lactoferrina estimula la interleucina-18 y el GM-CSF en tejido local, lo que potencia las células inmunitarias. Por ejemplo, la interleucina-18 potencia los linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales y el GM-CSF promueve la maduración y migración de células inmunitarias, incluyendo células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. En realizaciones específicas, la interleucina-18 (IL-18) potencia linfocitos CD4+, CD8+ y CD3+. Los expertos en la materia saben que la IL-18 es una citocina Th1 que actúa en sinergia con la interleucina-12 y la interleucina-2 en la estimulación de la producción de IFN-gamma en los linfocitos. También pueden mejorarse otras citocinas, por ejemplo, pero sin limitación IL-1b o IL-12 o IFN-gamma. También se contempla que la lactoferrina estimule la interleucina-18 después de administración intratumoral, lo que inhibe la angiogénesis y por lo tanto tiene actividad contra células tumorales que dependen de neovascularización.

Se describe también un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de complementar un sistema inmunitario local o sistémico aumentando la cantidad de lactoferrina en la piel cercana al tumor. Preferiblemente, la composición de lactoferrina se administra por vía tópica. Como se ha indicado anteriormente, la administración cerca del tumor incluye administración cerca o adyacente a los bordes del tumor o directamente en el área marginal del tumor. Se contempla que la lactoferrina estimule la interleucina-18 y el GM-CSF en el tejido local (por ejemplo, queratinocitos), lo que potencia a las células inmunitarias. Por ejemplo, la interleucina-18 potencia los linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales y el GM-CSF promueve la maduración y migración de células inmunitarias, incluyendo células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. En realizaciones específicas, la interleucina-18 (IL-18) potencia linfocitos CD4+, CD8+ y CD3+. Los expertos en la materia saben que la IL-18 es una citocina Th1 que actúa en sinergia con la interleucina-12 y la interleucina-2 en la estimulación de la producción de IFN-gamma en los linfocitos. También pueden potenciarse otras citocinas por ejemplo, pero sin limitación, IL-1b o IL-12 o IFN-gamma. También se contempla que la lactoferrina estimule la interleucina-18 después de administración intratumoral, lo que inhibe la angiogénesis y por lo tanto tiene actividad contra células tumorales que dependen de neovasularización.

C. Tratamientos de Combinación

Para aumentar la eficacia de la composición de lactoferrina humana de la presente invención, puede ser deseable combinar la composición de la presente invención con otros agentes eficaces en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como agentes anticancerosos, o con cirugía. Un agente "anticanceroso" puede repercutir negativamente sobre el cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo células cancerosas, induciendo la apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la frecuencia o el número de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento del tumor, reduciendo el aporte de sangre al tumor o a las células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas o contra un tumor, impidiendo o inhibiendo el avance del cáncer o aumentando la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. Los agentes anticancerosos incluyen agentes biológicos (bioterapia), agentes quimioterapéuticos y agentes radioterapéuticos. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad eficaz combinada para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar administrar al ser humano la composición de lactoferrina de la presente invención y el agente (o agentes) o factor (o factores) múltiple en el mismo lugar. Esto puede conseguirse administrando una sola composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes o administrando dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, o a tiempos lo suficientemente próximos como para dar como resultado un solapamiento de este efecto, en el que una composición incluya la composición de lactoferrina humana y la otra incluya el segundo agente (o agentes).

Como alternativa, la composición de lactoferrina de la presente invención puede ir delante o detrás del otro tratamiento con agentes anticancerosos en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las que el otro agente anticanceroso y la composición de lactoferrina se administran o se aplican por separado a la célula, se garantizaría generalmente que, entre el tiempo de cada administración, no expire un periodo de tiempo significativo, de manera que el agente y la composición de lactoferrina pudieran aún ejercer un efecto ventajosamente combinado en la célula. En dichos casos, se contempla que la célula pueda ponerse en contacto con/administrar ambas modalidades en aproximadamente 1-14 días de diferencia y, más preferiblemente, en aproximadamente 12-24 horas de diferencia. Sin embargo, en algunas situaciones, puede ser deseable ampliar significativamente el periodo de tiempo para el tratamiento, en el intervalo de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

1. Quimioterapia

Las terapias contra el cáncer también incluyen una diversidad de tratamientos basados en agentes químicos. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, agentes quimioterapéuticos antibióticos tales como Doxorubicina, Daunorrubicina, Adriamicina, Mitomicina (conocida también como mutamicina y/o mitomicina-C), Actinomicina D (Dactinomicina), Bleomicina, Plicomicina, alcaloides de plantas tales como Taxol, Vincristina, Vinblastina, agentes diversos tales como agentes basados en platino (por ejemplo, Cisplatino (CDDP)), etopósido (VP16), Factor de Necrosis Tumoral y agentes alquilantes, tales como, Carmustina, Melfalan (conocido también como alqueran, mostaza de L-fenilalanina, mostaza de fenilalanina, L-PAM o L-sarcolisina (un derivado de de mostaza de nitrógeno fenilalanina), Ciclofosfamida, Clorambucilo, Busulfán (conocido también como mileran), agentes basándose en taxano (por ejemplo, docetaxel) y Lomustina.

Algunos ejemplos de otros agentes incluyen, pero sin limitación, Carboplatino, Procarbamina, Meclorotamina, Irinotecan, Topotecan, Ifosfamida, Nitrosurea, Etopóxido (VP16), Tamoxifen, Raloxifeno, Toremifeno, Idoxifeno, Droloxifeno, TAT-59, Zindoxifeno, Trioxifeno, IC1182,780, EM-800, Agentes de Unión a Receptores de Estrógenos, Gemcitabina, Navelbina, inhibidores de la proteína Farnesil transferasa, Transplatino, 5-Fluorouracilo, peróxido de hidrógeno y Metotrexato, Temazolomida (una forma acuosa de DTIC), Milotarg, Dolastatina-10, Briostatina o cualquier variante análoga o derivada de los anteriores.

2. Agentes Radioterapéuticos

Los agentes y factores radioterapéuticos incluyen radiación y ondas que inducen lesiones en el ADN, por ejemplo, radiación γ , rayos X, radiación UV, microondas, emisiones electrónicas, radioisótopos y similares. La terapia puede conseguirse irradiando el lugar del tumor localizado con las formas de radiaciones descritas anteriormente. Lo más probable es que todos estos factores efectúen una amplia serie de lesiones al ADN, a los precursores del ADN, a la replicación y reparación del ADN y al conjunto y conservación de cromosomas.

Los intervalos de dosificación para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens para periodos de tiempo prolongados (de 3 a 4 semanas), a dosis individuales de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación varían para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la fuerza y del tipo de radiación emitida y de la captación por las células neoplásicas.

3. Cirugía

Aproximadamente un 60% de personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento contra el cáncer que puede usarse junto con otras terapias, tales como el tratamiento descrito en el presente documento, quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye resección en la cual todo o parte del tejido canceroso se elimina físicamente, se extirpa y/o se destruye. La resección tumoral se refiere a la retirada física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye cirugía por láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada con microscopio (cirugía de Mohs). Adicionalmente se contempla que la presente invención pueda usarse junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o cantidades eventuales de tejido normal.

Después de extirpar parte de todas las células cancerosas, tejido o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa, aplicación local del área con una terapia anticancerosa adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 meses. Estos tratamientos también pueden ser de diversas dosificaciones.

4. Otros Agentes Bioterapéuticos

Para mejorar la eficacia terapéutica de tratamiento, se contempla que puedan usarse otros agentes biológicos en combinación con la presente invención. Estos agentes adicionales incluyen, sin limitación, agentes que influyen en la regulación positiva de los receptores de la superficie celular y uniones GAP, agentes citoestáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas frente a inductores apoptóticos u otros agentes biológicos así como bioterapia, tal como por ejemplo, hipertermia.

La hipertermia es un procedimiento en el que un tejido del paciente se expone a elevada temperatura (hasta 41,11 °C). En la aplicación de hipertermia local, regional o de todo el cuerpo pueden incluirse dispositivos de calentamiento externos o internos. La hipertermia local implica la aplicación de calor a una pequeña área, tal como un tumor. El calor puede generarse externamente con ondas de alta frecuencia que se dirigen a un tumor desde un dispositivo fuera del cuerpo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, que incluye cables o tubos huecos finos cargados con agua caliente, antenas microondas implantadas o electrodos de radiofrecuencia.

Un órgano o extremidad de un paciente se calienta por terapia regional, lo cual se consigue usando dispositivos que producen alta energía tales como imanes. Como alternativa, puede extraerse un poco de sangre del paciente y calentarla antes de perfundirla en un área que se calentará internamente. El calentamiento de todo el cuerpo también puede implementarse en casos en los que el cáncer se ha extendido por todo el cuerpo. Para este fin pueden usarse cobertores de agua caliente, cera caliente, espirales inductoras y cámaras térmicas.

La hormonoterapia también puede usarse junto con la presente invención. El uso de hormonas puede emplearse en el tratamiento de determinados cánceres tales como cáncer de mama, de próstata, de ovario o cáncer cervical para disminuir el nivel o bloquear los efectos de determinadas hormonas tales como testosterona o estrógeno y esto a menudo reduce el riesgo de metástasis.

La terapia con adyuvantes también puede usarse junto con la presente invención. El uso de adyuvantes o agentes inmunomoduladores incluye, pero sin limitación, factor de necrosis tumoral, alfa, beta y gamma interferón; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas.

5. Inmunoterapia

Los agentes inmunoterapéuticos generalmente se basan en el uso de células inmunoefectoras y moléculas que se

dirigen a y destruyen células cancerosas. Las células inmunoefectoras pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de terapia o puede reunir otras células para destruir realmente células efectoras. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (agente quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina de la tosferina, etc.) y servir simplemente como un agente diana. Como alternativa, el efecto puede ser un linfocito que lleva una molécula superficial que interacciona, directa o indirectamente, con una célula tumoral diana. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK.

Se contempla que las vacunas que se usan para tratar el cáncer pueden usarse en combinación con la presente invención para mejorar eficacia terapéutica de tratamiento. Dichas vacunas incluyen vacunas peptídicas o vacunas con células dendríticas. Las vacunas peptídicas pueden incluir cualquier antígeno específico contra tumor que reconozca los linfocitos T citolíticos. Adicionalmente además, un experto en la materia es consciente que la vacunación con células dendríticas comprende células dendríticas que se impulsan con un péptido o un antígeno y las células dendríticas impulsadas se administran al paciente.

Los ejemplos de antígenos específicos contra tumores que van a usarse como vacunas en melanoma incluyen, pero sin limitación, gp100 o MAGE-3. Estos antígenos se administrarán como vacunas peptídicas y/o como vacunas de células dendríticas.

D. Ejemplos

Para demostrar realizaciones preferidas de la invención se incluyen los siguientes ejemplos. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el autor de la invención para el buen funcionamiento de la realización práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su realización práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían apreciar, en vista de la presente descripción, que pueden realizarse varios cambios en las realizaciones específicas que se describen y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin alejarse del ámbito de la invención. Los ejemplos 13 a 23 son ejemplos comparativos.

Ejemplo 1

Inhibición de crecimiento tumoral por rhLF

Se usó carcinoma de células escamosas humanas (O12). Las células se inyectaron en el costado derecho de ratones atímicos desnudos. La rhLF se administró por vía intratumoral (49 animales, 7 dosis que variaban de 0,05 µg a 125 µg por dosis), por vía intravenosa (7 animales, 125 µg/dosis) o por vía oral (7 animales 20 mg/dosis). Los animales de control se trataron solamente con el vehículo; a los animales de control no se les administró rhLF. La rhLF se administró dos veces al día durante cinco días (grupo de administración intravenosa) o durante ocho días (todos los demás grupos) comenzando 11 días después de la inoculación con células tumorales para permitir la formación de tumores establecidos.

La eficacia del tratamiento se evaluó midiendo el tamaño del tumor sólido durante y al final del experimento; también se determinaron los pesos corporales en el momento de las mediciones tumorales. Como se observa en la Figura 1 y en la Tabla 1, el tratamiento con rhLF redujo porcentajes de crecimiento tumoral con respecto al control del 46% al 80%. De hecho, el tratamiento oral con 20 mg de rhLF redujo más significativamente el crecimiento tumoral, al 80% en comparación con el control (p=0,0073).

Tabla 1 Resumen de inhibición del crecimiento tumoral por rhLF en el modelo de tumor O12 en ratones

	Inhibición con Respecto al Placebo		Valor de p	
	Día 19*	Día 28*	Día 19*	Día 28*
Administración Intratumoral N=49	28%	46%	0,139	0,0263**
Administración Intravenosa N=7	55%	65%	0,0666	0,0233**
Administración Oral N=7	76%	80%	0,0175**	0,0073***
*después de comenzar el tratamiento ** valor estadísticamente significativo (p<0,05) *** valor estadísticamente muy significativo (p<0,01)				

Los resultados de este estudio demostraron que la rhLF administrada por vías múltiples inhibió significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de células escamosas en ratones, siendo la administración oral la más eficaz. Basándose en estos resultados, se consideró adicionalmente que la lactoferrina oral incidía en el tumor potenciando la actividad celular inmunitaria.

Ejemplo 2

Evaluación de la rhLF en tipos de tumores

5 Se inyectaron células tumorales de una amplia serie de tumores en el costado derecho de ratones atímicos desnudos. A los animales se les administró rhLF, hLF natural o LF bovina por vía oral. Los animales de control se trataron sólo con el vehículo y no se les administró rhLF. La rhLF se administró una o dos veces al día durante uno, cinco, siete o catorce días u ocho días comenzando aproximadamente once días después de la inoculación con las células tumorales para permitir la formación de tumores establecidos o en cualquier otro momento tal como se realiza generalmente con regímenes convencionales o conocidos.

10 La eficacia del tratamiento se evaluó midiendo el tamaño del tumor sólido durante y al final del experimento; también se determinaron los pesos corporales en el momento de las mediciones del tumor. La respuesta inmunitaria se midió midiendo la cantidad de citocinas, linfocitos T y linfocitos NK en circulación y en el intestino.

15 **Ejemplo 3**

Efecto de la administración oral de rhLF y bLF

20 Por vía oral se administró a los ratones lactoferrina humana recombinante y lactoferrina bovina y se midió la producción de IL-18 en el intestino delgado.

25 Los ratones se trataron diariamente durante tres días con 65 mg/kg al día de rhLF, 300 mg/kg/día de rhLF o 300 mg/kg/día de bLF. Para un control, a los ratones solamente se les administró el vehículo farmacéutico. Veinticuatro horas después de la administración de la LF o del control durante 3 días, los animales se pesaron y se extrajo sangre y suero. El suero se usó para análisis ELISA de citocinas.

30 Además, en estos momentos, los animales se sacrificaron y se extirpó el tejido del intestino delgado para análisis posterior. El epitelio del intestino delgado se homogeneizó usando un tampón de lisis que consistía en PBS, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y dodecilsulfato de sodio al 0,1% que contenía Fenil Metilsulfonil fluoruro 10 µg/ml. El homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta que se ensayó para detectar niveles de IL-18.

35 Como se observa en las Tablas 2 y 3, la administración de rhLF a ambas dosis potenció significativamente las cantidades de IL-18 tanto en el suero como en el extracto intestinal. La LF bovina produjo un menor aumento en los niveles de IL-18 intestinales y no aumentó los niveles séricos de IL-18.

Tabla 2. Efecto de rhLF y bLF sobre los niveles de IL-18 en el intestino y en suero

	Extracto Intestinal (pg)	Suero (pg)
Control	955	141
bLF 300 mg/kg	4,515	134
rhLF 65 mg/kg	7,879	259
rhLF 300 mg/kg	8,350	328

40 **Tabla 3. Estimulación por rhLF y bLF de niveles de IL-18 en el intestino y en suero**

	Extracto Intestinal		Suero	
	% aumento	Valor de P	% aumento	Valor de P
Aumento sobre el Control				
bLF - 300 mg/kg	373%	0,0086	-5%	0,5411
rhLF - 65 mg/kg	725%	0,0034	84%	0,0132
rhLF -300 mg/kg	775%	0,0001	132%	0,0007
Aumento sobre bLF				
- 65 mg/kg rhLF	75%	0,1490	94%	0,0366
-300 mg/kg rhLF	85%	0,0617	145%	0,0084

Ejemplo 4**Efecto de la administración oral de rhLF sobre la actividad de NK *in vivo***

- 5 Por vía oral se trataron ratones Balb/c vírgenes con rhLF o placebo una vez al día durante 3 días (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Régimen de Tratamiento

	Tratamiento *	Nº	Dosis (mg/kg)	Vía	Programa
Grupo 1	Placebo	6	0	--	--
Grupo 2	rhLF	7	300 mg/kg/día	Oral	3 días

- 10 El día 4, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazo. Los linfocitos NK se separaron usando un ensayo de separación de células con perlas magnéticas (MACS anti-NK - DX5) y se contaron. Después las células se ensayaron *in vitro* para detectar la actividad de NK contra dianas YAC (Cromosomas Artificiales de Levadura) usando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).
- 15 La Tabla 5 muestra que el tratamiento oral con rhLF produjo un aumento significativo de la actividad de NK *ex-vivo* contra células diana YAC (10% @ 30:1 frente 2,8% del grupo control). En los ratones tratados con placebo no se observaron cambios significativos en la actividad de NK.

Tabla 5. Actividad NK en ratones tratados con rhLF oral

Control							
Bajo	Medio	Alto					
0,056	0,09	0,407					
Placebo			Tratados con rhLF				
Proporción E:T (Efectoras: Diana)	Datos de partida % de citotoxicidad		Datos sin procesar		% de citotoxicidad		
	Mezcla de células E:T	Control células E	Final	Mezcla de células E:T	Control células E	Final	Aumento sobre ctrol
30:1	0,281	0,215	2,86	0,358	0,267	9,81	7**
15:1	0,176	0,110	2,85	0,214	0,143	4,12	1,3
7,5:1	0,117	0,054	2,21	0,131	0,074	0,44	0
3,7:1	0,086	0,030	0,19	0,096	0,042	0	0
* % de citotoxicidad = [(mezcla células efectoras:diana – ctrl células efectoras)] – ctrl. bajo/[(ctrl alto – ctrl bajo)] X 100							
** p < 0,05 ((valor p de 2 colas)							

- 20 **Ejemplo 5**
- Efecto de la administración oral de rhLF sobre GM-CSF *in vivo***
- 25 A los ratones se les administró, por vía oral, lactoferrina humana recombinante o placebo y se midió la producción de GM-CSF en el intestino delgado.

- 30 Se trataron ratones (5 animales por grupo) durante tres días diariamente con 300 mg/kg/día de rhLF. Para un control, a los ratones solamente se les administró el vehículo farmacéutico. Veinticuatro horas después de la administración de LF o placebo durante 3 días, los animales se pesaron y se extrajo el tejido del intestino delgado para análisis posterior. El epitelio del intestino delgado se homogeneizó usando un tampón de lisis que consistía en PBS, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y dodecilsulfato de sodio al 0,1% que contenía Fenil Metilsulfonil fluoruro 10 µg/ml. El homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta que se ensayó para detectar niveles de GM-CSF usando un kit para ELISA.

- 35 Como se muestra en la Tabla 6, el tratamiento con rhLF aumentó la producción de una citocina inmunoestimuladora clave, el GM-CSF, en el intestino delgado en relación con los animales tratados con placebo.

Tabla 6. Efecto de rhLF sobre niveles de GM-CSF en el intestino y en suero

	Media (DTM) en pg	Aumento sobre Placebo
Placebo	6,48 (0,32)	-
300 mg/kg rhLF	7,74(0,19)	19,4% (p<0,01)

Ejemplo 6**5 Combinación de hLF con quimioterapia**

Se inyectó una línea celular de carcinoma escamoso murino (SCCVII) en la base de la boca a través de la piel del cuello de ratones C3H inmunocompetentes (Día 0). Cinco días después de la implantación de las células tumorales (Día 5) se realizó una incisión en la piel en la parte inferior del cuello y una disección quirúrgica reveló los tumores establecidos. Los tumores se midieron en tres dimensiones con calibradores.

Los ratones portadores del tumor se asignaron al azar en un grupo de control y en siete grupos que recibieron rhLF y/o cisplatino. La rhLF (4 mg; 200 mg/kg) se administró una vez al día por sonda oral durante 8 días los días 5 a 12. Se administró cisplatino a una sola dosis de 5 mg/kg proporcionada por vía intraperitoneal al inicio (día 5), a la mitad (día 8) o al final (día 5) de la terapia con rhLF. Los animales se sacrificaron el día 12 después de la implantación y las masas tumorales residuales se midieron y se procesaron para análisis adicional posterior.

Tabla 7. Grupos Experimentales

	Descripción	N	rhLF mg/kg	Cisplatino
Grupo A	Placebo	5	0 (Placebo)	0
Grupo B	solo rhLF	5	200 mg/kg	0
Grupo C	CP Día 5	5	0	5 mg/kg el día 5*
Grupo D	CP Día 8	5	0	5 mg/kg el día 8*
Grupo E	CP Día 12	4	0	5 mg/kg el día 12
Grupo F	rhLF/CP-5	5	200mg/kg	5 mg/kg el día 5*
Grupo G	rhLF/CP-8	5	200 mg/kg	5 mg/kg el día 8*
Grupo H	RhLF/CP-12	5	200 mg/kg	5 mg/kg el día 12*

Los ratones tratados solo con rhLF, solo con cisplatino o con los dos agentes, mostraron una inhibición del crecimiento tumoral (TGI) con respecto a los animales tratados con placebo. Se observó una inhibición máxima en el grupo que había recibido las dos terapias (Tabla 7 y Figura 2).

En todos los casos, los animales que recibieron rhLF + cisplatino mostraron una TGI con respecto al grupo de interés que había recibido solo cisplatino. Cuando se agruparon para análisis, los animales que recibieron rhLF + cisplatino mostraron una TGI del 77% con respecto a los animales tratados con placebo (P<0,0001), una TGI del 66% con respecto a rhLF sola (P<0,01) y una TGI del 63% de TGI con respecto a cisplatino solo (P<0,01).

La dosificación con cisplatino inmediatamente antes de comenzar la administración de rhLF (rhLF + CP-5) o durante el periodo de administración de rhLF (rhLF + CP-8) proporcionó un mayor beneficio incremental que cuando se administró cisplatino después de finalizar la terapia con rhLF (rhLF + CP-12). Sin embargo, únicamente el régimen solapado (RhLF + CP-8) proporcionó una mejora estadísticamente significativa (P<0,01) de TGI del 77% sobre cisplatino solo (CP Día 8).

Tabla 8. Inhibición del Crecimiento Tumoral (TGI) por el Grupo de Tratamiento

Grupo	Crecimiento (DTM)	Con respecto a Placebo*	
		TGI (%)	Valor de P
A (Placebo)	741 (79)	-	-
B (solo rhLF)	496(155)	33%	0,0989
C (CP Día 5)	240(137)	68%	0,0066
D (CP Día 8)	693(146)	6%	0,3898

Grupo	Crecimiento	Con respecto a Placebo*	
	(DTM)	TGI (%)	Valor de P
E (CP Día 12)	433(175)	42%	0,0634
F (rhLF + CP-5)	14(5)	98%	<0,0001
G (rhLF + CP-8)	159(48)	79%	0,0001
H (rhLF + CP-12)	331 (47)	55%	0,0011
C a E (todos con CP)	457 (96)	38%	0,0564
F a H (todos con rhLF/CP)	168 (40)	77%	<0,0001
* Inhibición y valor de P de una cola con respecto al grupo con placebo			
** Inhibición y valor de P de una cola en comparación con los grupos respectivos de Cisplatino			

Ejemplo 7

Dependencia de la dosis de la combinación de hLF con quimioterapia

5 Se inyectó una línea celular de carcinoma escamoso murino (SCCVII) en la base de la boca a través de la piel del
 10 cuello de ratones C3H inmunocompetentes (Día 0), como se ha descrito en el Ejemplo 6. El Día 5, después de la
 implantación inicial, los tumores se midieron para determinar la línea basal, después se trataron solo con cisplatino
 (Día 8, por vía i.p., 5 mg/kg) o con cisplatino más tres dosis de rhLF oral (diariamente por sonda durante 7-8 días
 desde el día 5 al 11/12). Los animales se sacrificaron los días 11/12 y se midieron los tumores. Como se muestra en
 la Figura 3, hubo una inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis en los animales que recibieron tanto
 rhLF como cisplatino en comparación con los animales que solo recibieron cisplatino.

Ejemplo 8

Combinación de hLF con Docetaxel

15 Se inyectó una línea celular de carcinoma escamoso murino (SCCVII) en la base de la boca a través de la piel del
 20 cuello de ratones C3H inmunocompetentes (Día 0), como se ha descrito en el Ejemplo 7. El día 5 después de la
 implantación inicial, los tumores se midieron para determinar la línea basal, después se trataron solo con placebo
 por vía oral (una vez al día desde el día 5 al 12; 6 animales), con placebo y docetaxel (por vía i.v. embolada de 31,3
 mg/kg de docetaxel el día 8; 9 animales), o con docetaxel más rhLF por vía oral (200 mg/kg, administrados una vez
 al día por sonda desde el día 5 al 12; 9 animales) Los animales se sacrificaron el Día 14 y se midieron los tumores.
 El docetaxel solo produjo una inhibición de crecimiento tumoral con respecto a placebo y la combinación de rhLF y
 25 docetaxel indujo una mayor inhibición tumoral. En la Tabla 9 se muestra la inhibición y los valores de p (de 1 cola).

Tabla 9. Inhibición del Crecimiento Tumoral (TGI) por Grupo de Tratamiento

Grupo	Crecimiento	Con Respecto al Placebo*		Con Respecto a Docetaxel	
	(DTM)	TGI (%)	Valor P	TGI (%)	Valor P
Placebo	5,157(497)	--	--	--	--
Docetaxel	2,103(209)	59%	<0,0001	--	--
Docetaxel + rhLF	1,288 (286)	75%	<0,0001	39%	0,0175

Ejemplo 9

Combinación de hLF con radioterapia

30 Se inyectó una línea celular de carcinoma escamoso murino (SCCVI I) en la base de la boca a través de la piel del
 35 cuello de ratones C3H inmunocompetentes (Día 0). Cinco días después de la implantación de las células tumorales
 (Día 5), se realizó una incisión en la piel en la parte inferior del cuello y una disección quirúrgica reveló los tumores
 establecidos. Los tumores se midieron entre tres dimensiones con calibradores.

Los ratones portadores del tumor se asignaron al azar en seis grupos que recibieron rhLF (200 mg/kg) y/o
 radioterapia como se describe a continuación. La rhLF (4 mg; 200 mg/kg) se administró por sonda oral una vez al día
 40 durante 8 días desde el día 5 al 12. La radioterapia se administró como una sola dosis de 2 Gray proporcionada al

inicio (Día 5) o durante (día 8) de la terapia con rhLF. Los animales se sacrificaron el día 14 después del tratamiento y las masas tumorales residuales se midieron y se procesaron para análisis adicional posterior.

Tabla 10. Grupos Experimentales

	Descripción	Nº	rhLF mg/kg*	Radiación
Grupo A	Placebo	10	0 (Placebo)	Ninguno
Grupo B	solo rhLF	10	200 mg/kg	Ninguno
Grupo C	Radiación día 5	8	0	2 Gray el día 5
Grupo D	rhLF/Rad día 5	10	200 mg/Kg	2 Gray el día 5
Grupo E	Radiación día 8	10	0	2 Gray el día 8
Grupo F	rhLF/Rad día 8	10	200 mg/kg	2 Gray el día 8
* Desde el día 5 al 12, se administró rhLF/placebo una vez al día por sonda oral.				

5 Los ratones que recibieron solo rhLF, solo radioterapia o terapia de combinación mostraron una inhibición de crecimiento tumoral (TGI) significativa con respecto a los ratones tratados con placebo. Los ratones que recibieron tanto rhLF como radiación mostraron un aumento moderado en cuanto a la TGI sobre monoterapia con rhLF (28%, P<0,05) y radiación (15%, P=0,1207).

10

Tabla 11. Inhibición del Crecimiento Tumoral (TGI) por Grupo de Tratamiento:

Grupo	Crecimiento (DTM)	Con respecto al Placebo	
		Inhibición*	Valor de P*
A (Placebo)	2348 (395)		-
B (solo rhLF)	1074(163)	54%	0,0040
C (Radiación día 5)	827(105)	65%	0,0021
D (rhLF/Rad día 5)	750(125)	68%	0,0006
E (Radiación día 8)	977(112)	58%	0,0018
F (rhLF/Rad día 8)	797(119)	66%	0,0007
C/E (dos radiaciones)	911 (78)	61%	<0,0001
D/F (dos rhLF/Rad)	774 (84)	67%	<0,0001
* Inhibición y valor de P de 1 cola en comparación con el grupo placebo			

15 Por tanto, la lactoferrina estimuló el sistema inmunitario. Adicionalmente aún, la lactoferrina en combinación con cisplatino, docetaxel y radiación produjo inhibición del crecimiento tumoral.

15

Ejemplo 10

Administración oral de hLF en seres humanos

20 En dos estudios diferentes realizados en centros múltiples en cuatro países (Argentina, Brasil, Chile, Estados Unidos) se administró, por vía oral, lactoferrina humana recombinante a pacientes humanos con una serie de tipos de cánceres metastásicos en los que había fracasado la quimioterapia convencional. La rhLF se administró a dosis de 1,5 a 9 gramos diariamente en dos dosis divididas en ciclos de 14 cada una con una diferencia de 14 días.

25 La progresión del tamaño del tumor se monitorizó mediante exploración CT y se disponía de marcadores tumorales. Las exploraciones CT se realizaron en la línea basal y después de cada periodo de 8 semanas una vez iniciado el tratamiento y también se compararon con una exploración previa a la línea basal realizada antes de la incorporación en el estudio. Los marcadores tumorales se midieron cada 4 semanas. Se extrajeron muestras de sangre para medir subclases de linfocitos circulantes y la actividad de linfocitos NK. Se extrajeron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2 e IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ circulantes.

30

De diecinueve pacientes evaluables (aquellos con una exploración CT en la línea basal y al menos una exploración

después del tratamiento), nueve pacientes (47%) presentaron enfermedad estable mediante los criterios RECIST en el momento de la primera exploración después del tratamiento. Los pacientes con una amplia serie de tipos tumorales mostraron un beneficio desde la administración con lactoferrina.

5 La Tabla 12 muestra la respuesta tumoral de cinco pacientes individuales con diferentes tipos tumorales. En todos los casos, el crecimiento en porcentaje del tamaño del tumor antes del tratamiento de rhLF (entre paréntesis se muestra la duración de tiempo correspondiente) y el crecimiento del tumor en los dos periodos de tiempo siguientes, medido por CT, mostró una disminución en su porcentaje de crecimiento tumoral o una disminución real.

10 **Tabla 12. Respuesta Tumoral de Pacientes que han Recibido rhLF por vía oral para el Tratamiento de Cáncer Metastásico**

Paciente N°	Cáncer	Tratamiento previo % Crecimiento (semanas)	Después del Tratamiento 1 % Crecimiento (semanas)	Después del Tratamiento 2 % Crecimiento (semanas)
N° 204	Mama	40% (8)	0% (10)	0% (6,5)
N° 106	Melanoma	24% (19)	-18% (11)	Aún no realizado
N° 104	Gástrico	25% (5,5)	10% (10)	- 5% (7)
N° 102	Ovario	30% (21)	-5% (10,5)	- 7% (8,5)
N° 007	Pulmonar	160% (5,5)	13% (7,5)	12% (8,5)

Ejemplo 11

15 **Terapia de combinación con hLF por vía oral en seres humanos**

Por vía oral, se administró lactoferrina humana recombinante, a pacientes humanos para inhibir el crecimiento tumoral, sola o en combinación con regímenes anticancerosos convencionales.

20 En resumen, la rhLF se administró usando el régimen óptimo y las dosis identificadas en el Ejemplo 10 y como parte de la terapia de combinación se usó el régimen (o regímenes) anticanceroso convencional para el tipo de tumor seleccionado. La FDA aprobó la vía de administración y el régimen de la terapia anticancerosa adicional para esta indicación o como se describa en una publicación revisada por expertos.

25 La progresión del tamaño del tumor se monitorizó mediante exploraciones CT y se disponía de marcadores tumorales. Las exploraciones CT se realizaron en la línea basal y después de un periodo cada ocho semanas una vez iniciado el tratamiento. Los marcadores tumorales se midieron cada cuatro semanas una vez iniciado el tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre para medir subclases de linfocitos circulantes y la actividad de linfocitos NK. Se extrajeron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2 e IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ circulantes.

30 **Ejemplo 12**

Inmunoestimulación después de administración de rhLF por vía oral

35 Por vía oral se trataron ratones Balb/c vírgenes con rhLF o placebo una vez al día durante 3 días. Un día después (día 4), los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazo. Los linfocitos NK se separaron usando un ensayo de separación de células con perlas magnéticas (MACS anti-NK - DX5) y se contaron. Después las células se ensayaron *in vitro* para detectar la actividad de NK contra dianas YAC usando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

40 Como se muestra en la Tabla 4, el tratamiento oral con rhLF produjo un aumento significativo de la actividad de NK *ex-vivo* contra células diana. A una proporción E:T de 30:1 E:T la administración de rhLF produjo un aumento relativo del 243% sobre los animales tratados con placebo (del 2,86% al 9,81%; $p < 0,05$).

45 **Ejemplo 13**

Efecto de administración intravenosa

50 Por vía intravenosa se administró a los animales, preferiblemente ratas, lactoferrina recombinante, lactoferrina bovina y lactoferrina natural y se midió la producción de IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ en el plasma, suero y en concentrado de células sanguíneas.

En resumen, las ratas se trataron durante catorce días consecutivos con 0,05 μ g a 1000 μ g por dosis. Para un control, a las ratas se les administró solo el vehículo farmacéutico. A momentos específicos después de la administración de LF o control durante 0 días, 2 días, 3 días, 5 días, 9 días y 14 días, los animales se pesaron y se

extrajo sangre y suero. Se realizó un recuento de los niveles de linfocitos CD4+, CD8+ y NK de la sangre extraída. El plasma, el suero y el extracto de las células sanguíneas se usó para análisis ELISA de citocinas.

5 Así mismo, en el momento del día 24, los animales se sacrificaron y los tejidos se extrajeron para análisis posterior. Los tejidos se homogeneizaron usando un tampón de lisis que consistía en PBS, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y dodecilsulfato de sodio al 0,1% que contenía fenil metil sulfonil fluoruro 10 µg/ml. El homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta que se ensayó para determinar las citocinas IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-gamma.

10 Ejemplo 14

Quimioterapia de combinación de rhLF por vía intravenosa con otros agentes

15 Las células tumorales a ensayar se inyectaron en el costado derecho de ratones atímicos desnudos. A los animales se les administró por vía intravenosa solo rhLF y en combinación con otros regímenes anticancerosos como se ha descrito en el Ejemplo 13. Los animales de control se trataron solo con el vehículo; no se les administró rhLF. La rhLF se administró usando regímenes identificados como óptimos en los ensayos descritos en el Ejemplo 13. La terapia anticancerosa se administró usando regímenes convencionales o conocidos. La terapia comenzó aproximadamente 11 días después de la inoculación con las células tumorales para permitir la formación de tumores establecidos o en cualquier otro momento tal como se realiza generalmente con regímenes convencionales o conocidos.

20 Se evaluó la eficacia de los tratamientos individual y en combinación midiendo el tamaño del tumor sólido durante y al final del experimento; también se determinaron los pesos corporales en el momento de las mediciones del tumor.

25

Ejemplo 15

Administración intravenosa de hLF en seres humanos

30 Por vía intravenosa, se administró lactoferrina recombinante a pacientes para inhibir el crecimiento tumoral. En resumen, se administró rhLF a una dosis de 500 mg a día durante ocho días a pacientes que padecían cáncer no resecable o metastásico. Como alternativa, se administró rhLF durante uno a ocho días a pacientes que padecían cáncer metastásico a dosis diarias de 0,1, 1, 10, 100 y 1000 mg. La dosis se administró por vía intravenosa.

35 La progresión del tamaño del tumor se monitorizó mediante exploraciones CT y se disponía de marcadores tumorales. Las exploraciones CT se realizaron en la línea basal y después de un periodo cada 8 semanas una vez iniciado el tratamiento. Los marcadores tumorales midieron cada 4 semanas. Se extrajeron muestras de sangre para medir subclases de linfocitos circulantes y actividad de linfocitos NK. Se recogieron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-γ circulantes.

40

Ejemplo 16

Terapia de combinación con hLF por vía intravenosa

45 Por vía intravenosa, se administró lactoferrina recombinante a pacientes para inhibir el crecimiento tumoral, sola o en combinación con regímenes anticancerosos convencionales.

50 En resumen, se administró rhLF usando el régimen óptimo y las dosis identificadas en el Ejemplo 15 y como parte de la terapia de combinación se usó el régimen (o regímenes) anticanceroso convencional para el tipo de tumor seleccionado. La FDA aprobó la vía de administración y el régimen de la terapia anticancerosa adicional para esta indicación o como se describa en una publicación revisada por expertos.

55 La progresión del tamaño del tumor se monitorizó mediante exploraciones CT y se disponía de marcadores tumorales. Las exploraciones CT se realizaron en la línea basal y después de un periodo cada 8 semanas una vez iniciado el tratamiento. Los marcadores tumorales midieron cada 4 semanas. Se extrajeron muestras de sangre para medir subclases de linfocitos circulantes y actividad de linfocitos NK. Se recogieron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-γ circulantes

60 Ejemplo 17

Actividad de rhLF por vía intratumoral

65 Se inyectaron células tumorales de carcinoma de células escamosas orofaríngeas humanas 012 en el costado derecho de ratones atímicos desnudos. La lactoferrina humana recombinante y los controles con vehículo se administraron por inyección intratumoral. A cada animal se le administraron diferentes concentraciones de rhLF a dosis de 50 µl que consistían en cuatro inyecciones individuales de aproximadamente 12,5 µl de la dosis a diferentes

direcciones y ángulos (aproximadamente S/N/E/O) para garantizar que la dosis se distribuía uniformemente por todo el tumor (desplegamiento).

5 **Tabla 13. Programa de tratamiento de inyecciones intratumorales de lactoferrina humana recombinante en células tumorales de carcinoma de células escamosas humanas 012 en ratones desnudos**

Grupo	Régimen	Dosis de rhLF por animal en grupo					
		0	1	2	3	4	5
E. A	Una vez el día 1, destrucción 8 días después (ratones desnudos)	0	100 µg	250 µg	500 µg	250 µg*	No disponible
C	Dos veces/día durante 8 días comenzando el día 11 después de la inoculación, destrucción el día 20 (ratones desnudos)	0	25 µg	50 µg	125 µg	250 µg	500 µg

La Tabla 13 muestra el régimen seguido para cada grupo experimental y la dosis de rhLF por inyección para cada animal por grupo. En este estudio, la rhLF se administró directamente en el tumor. Diariamente se realizó un seguimiento de cada animal para detectar el crecimiento tumoral realizando mediciones externas del tumor protuberante con calibradores.

Usando este modelo, fue evidente una reducción significativa del crecimiento tumoral en los dos grupos tratados con rhLF con respecto a los animales de control. En comparación con el tamaño tumoral medio para las muestras de placebo agrupadas de los grupos A y C, los porcentajes de crecimiento tumoral, en los animales que recibieron una sola dosis de rhLF (Grupo A), se redujeron al 50% el día 11 después de la administración de rhLF ($p < 0,05$). Los porcentajes de crecimiento tumoral en animales que recibieron dosis dos veces al día (Grupo C) se redujeron al 56% cuando se compararon con el grupo de control agrupado ($p < 0,01$) (Véase la Figura 5).

Ejemplo 18

Inmunoestimulación después de rhLF intratumoral

Siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 17, a ratones C3H/HeJ normales se les implantó uno o dos tumores de ratón. Los tumores usados fueron las líneas celulares de tumores de ratón SCCVII y RIF. Después del establecimiento de los tumores en los ratones, los tumores se inyectaron por vía intratumoral diariamente durante 4 días con 250 ó 500 µg de rhLF por dosis o con control vehículo. Veinticuatro horas después de la última inyección intratumoral, los animales se sacrificaron y se examinó la sangre para determinar poblaciones de linfocitos. El número de linfocitos circulantes aumentó del 34% al 56% con respecto a los animales de control tratados con placebo (Tabla 14).

Tabla 14. Aumento de linfocitos circulantes después de administración intratumoral de rhLF

	CD3+	CD4+	CD8+
- Número de células			
- Placebo	2104	1800	785
- Tratados con rhLF	3291	2621	1054
- Aumento con rhLF	56%	46%	34%

Ejemplo 19

Quimioterapia de combinación de hLF con otros agentes

Las células tumorales a ensayar se inyectaron en el costado derecho de ratones atímicos desnudos. A los animales se les administró rhLF por vía intratumoral sola o en combinación con otros regímenes anticancerosos, como se describe en el Ejemplo 1 o en el Ejemplo 17.

Los animales de control se trataron solamente con el vehículo; a los animales de control no se les administró rhLF. La terapia anticancerosa se administró usando regímenes convencionales o conocidos. La terapia comenzó aproximadamente 11 días después de la inoculación con las células tumorales para permitir la formación de tumores

establecidos o en otro momento tal como se realiza generalmente con regímenes convencionales o conocidos.

La eficacia de los tratamientos individuales y de combinación se evaluó midiendo el tamaño del tumor sólido durante y al final del experimento; también se determinaron los pesos corporales en el momento de las mediciones del tumor.

Ejemplo 20

Administración intratumoral de hLF

Por vía intratumoral se administró lactoferrina recombinante a pacientes para inhibir el crecimiento tumoral.

En resumen, a pacientes que padecían cáncer no resecable o metastásico se les administró rhLF a una dosis de 1000 µg al día durante ocho días. Como alternativa, a pacientes que padecían cáncer metastásico se les administró rhLF durante uno a ocho días a dosis diarias de 10, 50, 100, 500 y 1000 µg. La dosis se administró por vía intratumoral.

La progresión del tamaño del tumor se monitorizó mediante escáneres TC y estaban disponibles marcadores tumorales. Los escáneres TC se realizaron en la línea basal y después de un periodo de cada 8 semanas una vez iniciado el tratamiento. Los marcadores tumorales se midieron cada 4 semanas. Se extrajeron muestras de sangre para medir las subclases de linfocitos circulantes y la actividad de linfocitos NK. Se extrajeron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-γ circulantes.

Ejemplo 21

Terapia de combinación con hLF intratumoral

Por vía intratumoral se administró lactoferrina recombinante a pacientes para inhibir el crecimiento tumoral, sola o en combinación con regímenes anticancerosos convencionales.

En resumen, se administró rhLF usando el régimen óptimo y las dosis identificadas en el Ejemplo 20 y como parte de la terapia de combinación se usó el régimen (o regímenes) anticanceroso convencional para el tipo de tumor seleccionado. La FDA aprobó la vía de administración y el régimen de la terapia anticancerosa adicional para esta indicación o como se describa en una publicación revisada por expertos.

La progresión del tamaño del tumor se monitorizó mediante escáneres TC y estaban disponibles marcadores tumorales. Los escáneres TC se realizaron en la línea basal y después de un periodo de cada 8 semanas una vez iniciado el tratamiento. Los marcadores tumorales se midieron cada 4 semanas después de iniciar el tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre para medir las subclases de linfocitos circulantes y la actividad de linfocitos NK. Se extrajeron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-γ circulantes.

Ejemplo 22

Administración tópica de hLF en seres humanos

En una formulación en gel se administró lactoferrina recombinante a pacientes para inhibir el crecimiento tumoral.

En resumen, a un paciente con enfermedad metastásica se le aplicó un gel con rhLF con fuerzas del 1 %, 2,5% u 8,5% dos veces al día a una lesión cancerosa en la piel o subcutánea. La aplicación del gel con rhLF continuó hasta la progresión del tumor.

La progresión del tamaño de la enfermedad metastásica se monitorizó mediante escáneres TC y estaban disponibles marcadores tumorales. Los escáneres TC se realizaron en la línea basal y después de un periodo de cada 8 semanas una vez iniciado el tratamiento. Los marcadores tumorales se midieron cada 4 semanas. Se extrajeron muestras de sangre para medir las subclases de linfocitos circulantes y la actividad de linfocitos NK. Se extrajeron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-γ circulantes.

Ejemplo 23

Terapia de combinación con hLF tópica

Se administró lactoferrina recombinante en una formulación en gel a pacientes para inhibir el crecimiento tumoral sola o en combinación con regímenes anticancerosos convencionales.

En resumen, se administró rhLF usando el régimen óptimo y las dosis identificadas en el Ejemplo 22 y como parte de la terapia de combinación se usó el régimen (o regímenes) anticanceroso convencional para el tipo de tumor seleccionado. La FDA aprobó la vía de administración y el régimen de la terapia anticancerosa adicional para esta indicación o como se describa en una publicación revisada por expertos.

La progresión del tamaño de la enfermedad metastásica se monitorizó mediante escáneres TC y estaban disponibles marcadores tumorales. Los escáneres TC se realizaron en la línea basal y después de un periodo de cada 8 semanas después de iniciarse el tratamiento. Los marcadores tumorales se midieron cada 4 semanas una vez iniciado el tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre para medir las subclases de linfocitos circulantes y la actividad de linfocitos NK. Se extrajeron muestras de plasma, suero y extracto de células sanguíneas para medir IL-18, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ circulantes.

Bibliografía citada

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Patente de Estados Unidos N° 5.629.001

Bezault J et. al., *Cancer Res.* 1994, 54(9): 2310-2.

Broxmeyer HE. *Blood* 1983; 61: 982-993.

Damiens E, et. al., *Biochim Biophys Acta.* 1998, 1402(3): 277-87.

Dhennin-Duthille I, et al., *J Cell Biochem.* 2000, 79(4): 583-93.

Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104: 1-18, 1998.

Gahr M, et al., *J Leukocyte Biol.* 1991 ; 49: 427-33.

Gertig y Hunter, *Semin. Cancer Biol.*, 8(4): 285-298, 1997.

Horowitz DA, et al., *J Immunol.* 1984; 132: 2370-4.

Ligo M, et al., *Clin Exp Metastasis.* 1999, 17(1): 35-40.

Kolmel, J. *Neurooncol.*, 38: 121-125, 1998.

KuharaT, et. al., *Nutr Cancer.* 2000, 38(2): 192-9.

Magi-Galluzzi et al., *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 20: 343-350, 1998.

Mangray y King, *Front Biosci.*, 3: D1148-1160, 1998.

Masuda C, et al. *Jpn J Cancer Res.* 2000, 91 (6): 582-8.

Mayer, *Radiat Oncol Investig.* 6: 281-8, 1998.

Mumby y Walter, *Cell Regul.*, 2: 589-598, 1991.

Natoli et al., *Biochem. Pharmacol.*, 56(8): 915-920, 1998.

Ohara, *Acta Oncol.* 37: 471-4, 1998.

Shau H, et al., *J Leukocyte Biol.* 1992; 51: 343-9.

Solyanik et. al., *Cell Prolif.*, 28: 263-278, 1995.

SpikG, et. al., *Adv Exp Med Biol.* 1994; 357: 13-9.

Stokke et. al., *Cell Prolif.*, 30(5): 197-218, 1997.

TanakaT, et al. *Jpn J Cancer Res.* 2000, 91(1): 25-33.

Tsuda H, et al., *Biofactors.* 2000; 12(1-4): 83-8.

Ushida Y, et al. *Jpn J Cancer Res.* 1999, 90(3): 262-7.

Wang WP, et al., *Jpn J Cancer Res.* 2000, 91 (10): 1022-7.

Yoo YC, et al., *Adv Exp Med Biol.* 1998, 443: 285-91.

Yoo YC, et al., *Jpn J Cancer Res.* 1997, 88(2): 184-90.

Aunque la presente invención y sus ventajas se han descrito con detalle, debe entenderse que, en el presente documento, pueden realizarse diversos cambios, sustituciones y modificaciones sin alejarse del alcance de la invención como se define en la descripción adjunta. Además, el alcance de la presente solicitud no pretende limitarse a las realizaciones particulares del proceso, maquinaria, preparación, composición de materiales, medios, métodos y etapas descritos en la memoria descriptiva. Como apreciará fácilmente un experto habitual en la materia, a partir de la descripción de la presente invención, pueden usarse los procesos, maquinarias, preparación, composiciones de materiales, medios, métodos o etapas, actualmente existentes o desarrollados posteriormente que realizan sustancialmente la misma función o consiguen sustancialmente el mismo resultado que el de las realizaciones correspondientes descritas en el presente documento de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, las descripciones adjuntas pretenden incluir dentro de su alcance dichos procesos, maquinarias, preparación, composiciones de materiales, medios, métodos o etapas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Lactoferrina humana para su uso en un método para reducir el crecimiento de, o disminuir, un neoplasma establecido, administrando por vía oral a un sujeto, que padece un neoplasma establecido, lactoferrina humana, en una cantidad suficiente para reducir el crecimiento de, o disminuir, el neoplasma en dicho sujeto.
2. La lactoferrina humana de la reivindicación 1, dispersada en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La lactoferrina humana de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha lactoferrina humana es lactoferrina humana recombinante.
- 15 4. La lactoferrina humana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el neoplasma se selecciona de melanoma, neoplasma pulmonar no microcítico, neoplasma pulmonar microcítico, hepatocarcinoma pulmonar, retinoblastoma, astocitoma, glioblastoma, leucemia, neuroblastoma, neoplasma de células escamosas, de cabeza, de cuello, de encía, de lengua, de mama, de páncreas, de próstata, renal, óseo, testicular, de ovario, mesotelioma, sarcoma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebral, de colon, de vejiga y hematopoyético.
- 20 5. La lactoferrina humana de la reivindicación 4, en el que el neoplasma es un neoplasma hematopoyético seleccionado de leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, síndrome mielodisplásico, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, mieloma múltiple y leucemia linfocítica crónica.
- 25 6. La lactoferrina humana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lactoferrina humana se administra en combinación con quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, bioterapia, radioterapia o una combinación de dichas terapias.
- 30 7. La lactoferrina humana de la reivindicación 6, en el que la quimioterapia se realiza con un agente basado en platino o con un agente basado en taxano.
8. La lactoferrina humana de la reivindicación 7, en la que la quimioterapia se realiza con cisplatino o con docetaxel.
9. La lactoferrina humana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que junto con dicha lactoferrina humana, administrada por vía oral, se administra un antiácido.
- 35 10. Un agente quimioterapéutico para su uso en el método definido en la reivindicación 1, en combinación con la lactoferrina humana administrada por vía oral.
11. Un antiácido para su uso en el método definido en la reivindicación 1, en combinación con la lactoferrina humana administrada por vía oral.

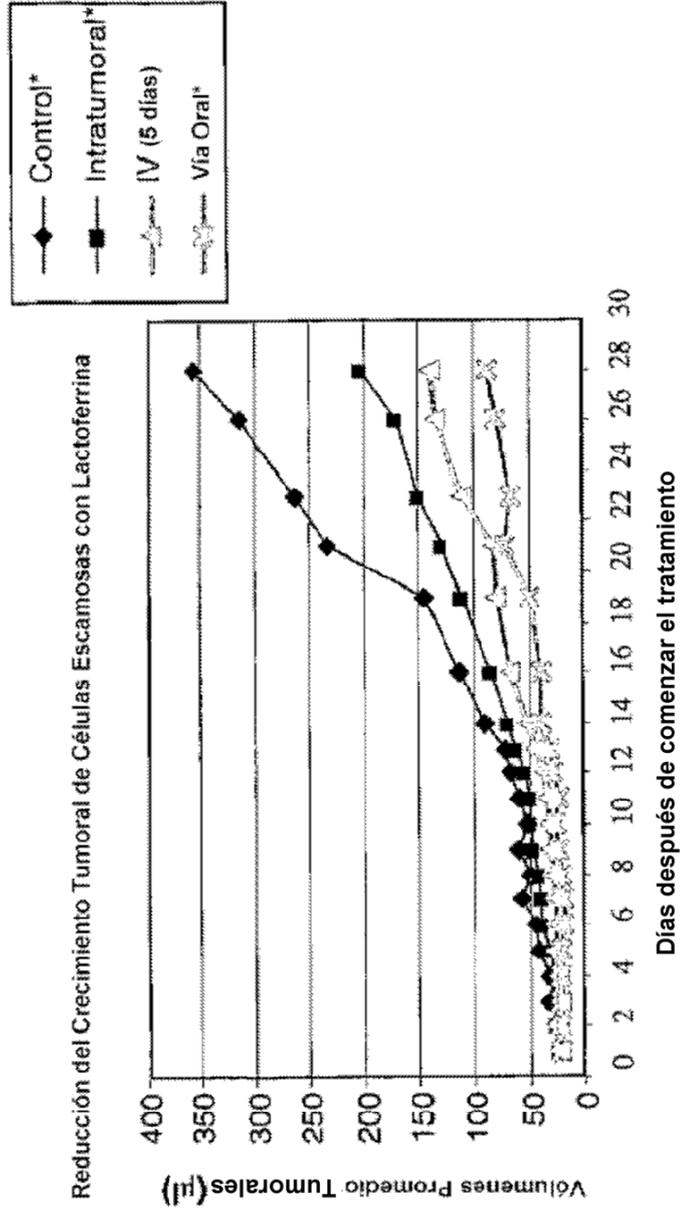


FIG. 1

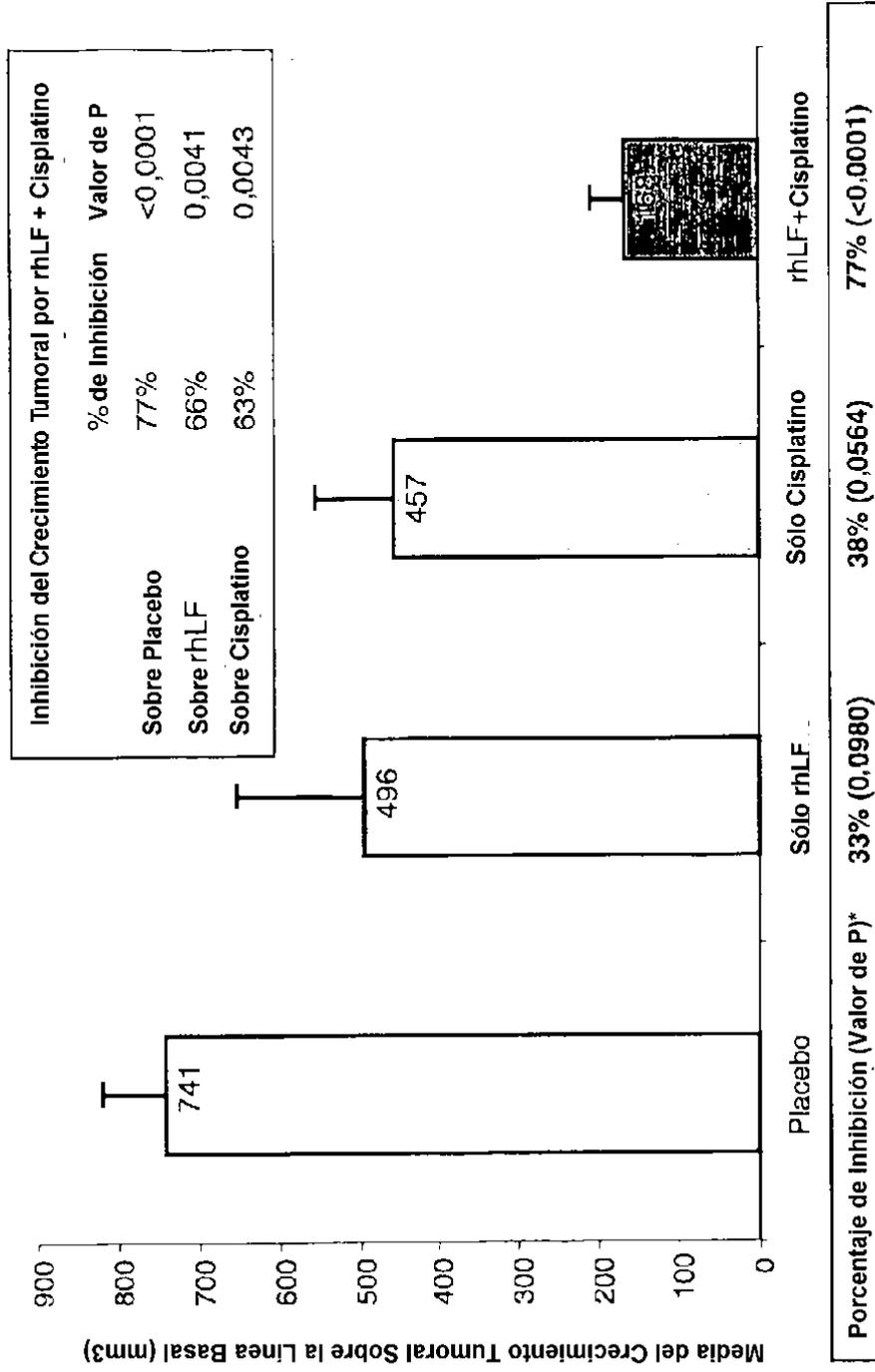


FIG. 2

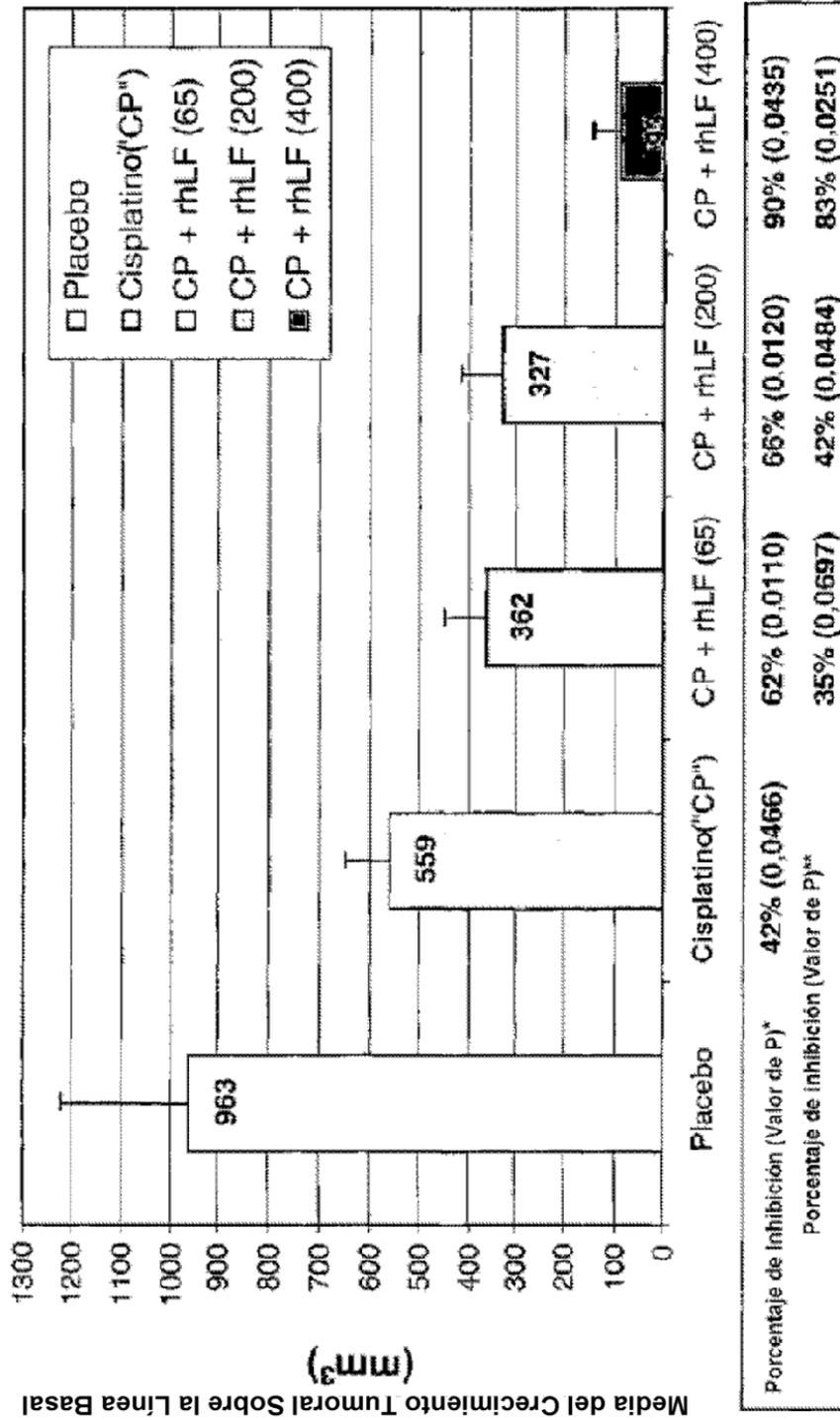


FIG. 3

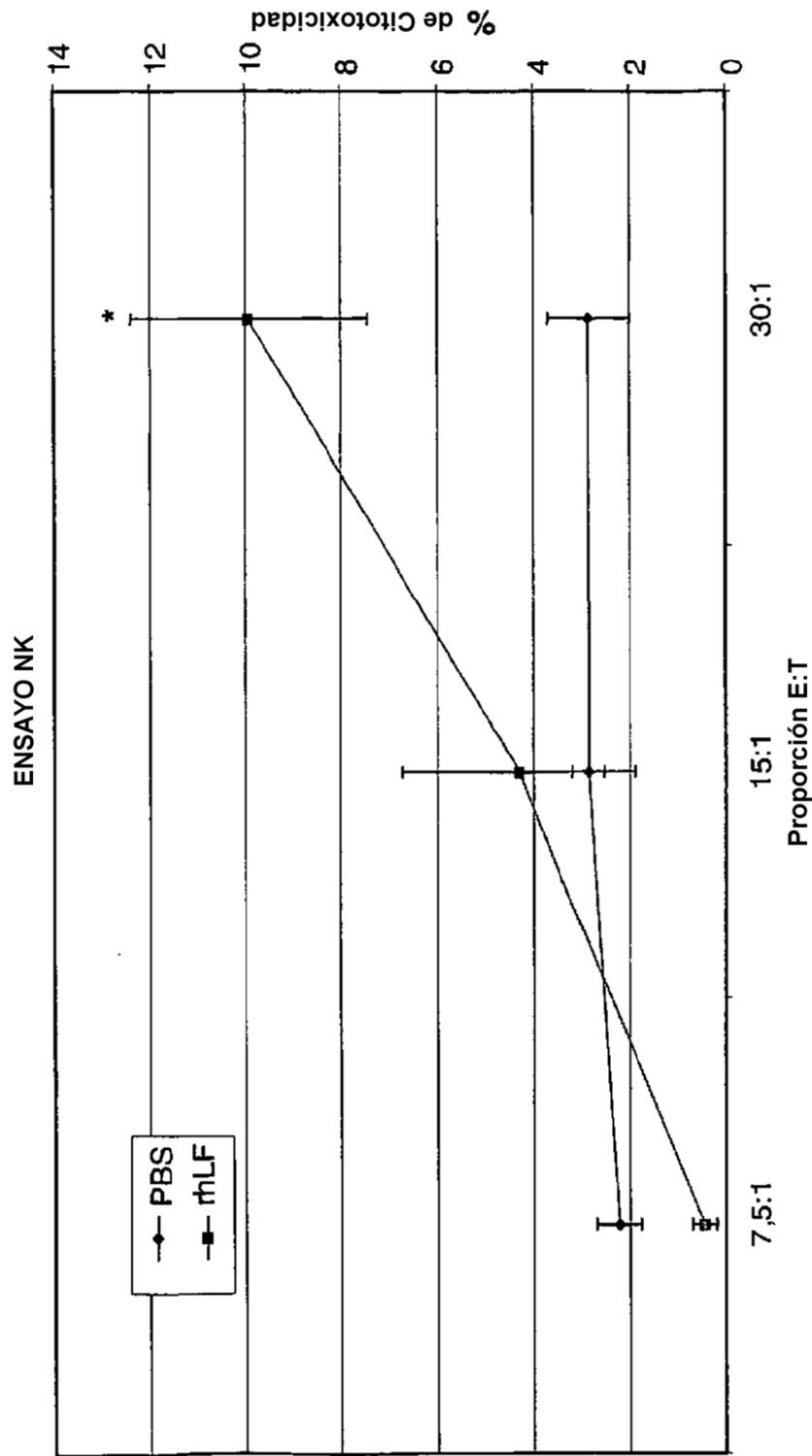


FIG. 4

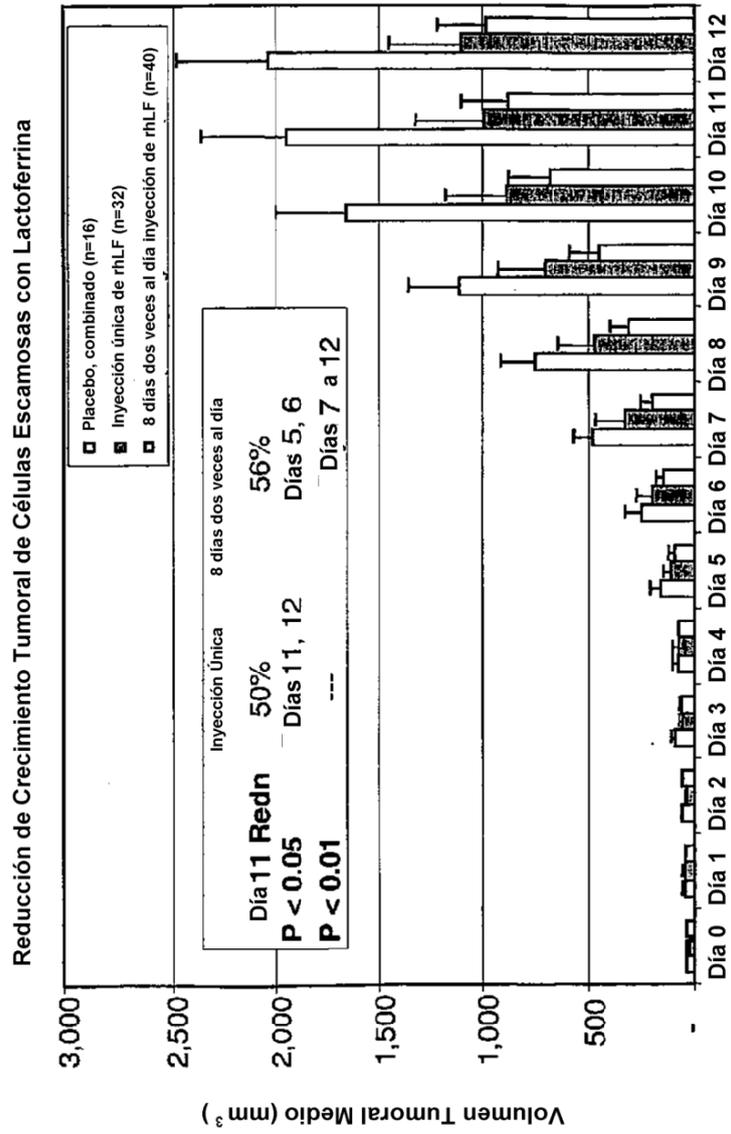


FIG. 5