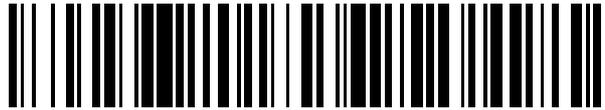


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 584**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10719223 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2430442**

54 Título: **Tecnologías de plataforma para enfermedades de origen espontáneo**

30 Prioridad:

11.06.2009 US 186342 P
14.05.2009 US 178391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2015

73 Titular/es:

OATMEAL BIOTECHNOLOGIES GROUP, L.L.C.
(100.0%)
2995 Woodside Road Suite 400
Woodside, CA 94062, US

72 Inventor/es:

FRANK, MATTHEW

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 539 584 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

Tecnologías de plataforma para enfermedades de origen espontáneo

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad para las solicitudes de patente provisionales de los EE.UU. 61/178.391, expedida el 14 de mayo de 2009, y 61/186.342, expedida el 11 de junio de 2009.

10 **Antecedentes de la invención**

El esfuerzo para mejorar las vidas humanas incluye el descubrimiento de nuevas rutas y mecanismos biológicos de acción así como nuevas modalidades de tratamiento y de diagnóstico. El descubrimiento de nuevos fármacos, compuestos, métodos o las combinaciones de cualquiera de los anteriores, para combatir diversas enfermedades, tales como el cáncer, es difícil debido a las exigencias reguladores así como a las consideraciones de tiempo y coste. Un estudio comprensivo de múltiples tratamientos es muy difícil de alcanzar en los ensayos clínicos con seres humanos por el mismo motivo. Estos motivos actúan como barreras en la vida real que impiden los esfuerzos de las compañías, las organizaciones sin ánimo de lucro y los individuos para salvar vidas humanas y/o mejorar las condiciones de vida de los seres humanos que padecen diversas enfermedades. Lo que se necesita es un sistema mejorado para estudiar diversas enfermedades tal como una combinación de factores que pueden investigarse para determinar el resultado biológico y/o la respuesta y el resultado fisiológico más óptimo. Dicho sistema puede utilizarse para traducir la información para general fármacos nuevos o mejorados, compuestos y protocolos de tratamiento mejorados para proporcionar el uso eficaz máximo de los esfuerzos médicos y científicos para ayudar a los individuos con diversas enfermedades, tales como enfermedades de origen espontáneo que implican respuestas inducidas por el hospedador (por ejemplo, diabetes, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, neurológicas, alérgicas).

Las enfermedades de origen espontáneo, tales como la diabetes, se han observado en animales de compañía, tales como perros y gatos (Hoenig M, Mol. Cell. Endocrinol. 197: 221-229 (2002)). Por ejemplo, Davison *et al.* describe estudios realizados sobre autoanticuerpos para GAD65 y IA-3 en la diabetes mellitus de origen espontáneo (Davison LJ *et al.*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 126: 83-90 (2008)). Hoenig *et al.* describieron un ensayo cualitativo para los anticuerpos de células beta en perros con diabetes en Veterinary Immunology and Immunopathology, 32: 195-203 (1992)). Se han descrito otras enfermedades de origen espontáneo en perros en diversas referencias, por ejemplo, Tsai *et al.*, Mamm. Genome, 18:444-451 (2007).

Además de la diabetes, se han observado otras enfermedades de origen espontáneo, tales como el cáncer y las enfermedades autoinmunitarias. Paoloni *et al.* describen la integración del estudio de perros con cáncer de origen natural con el estudio de la biología del cáncer en seres humanos para identificar genes asociados con cáncer, estudiar factores ambientales de riesgo, entender la biología del tumor y su progresión y evaluar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el cáncer. (Nature, 8: 147-156 (2008)). El Consorcio de Oncología y Genómica Comparativa Canina (CCOGC) es el resultado de muchos esfuerzos colaborativos para usar al perro como un modelo para investigar el estudio del cáncer en esfuerzos para mejorar tanto el de seres humanos como el de perros. Nature Biotechnology 24(9): 1065-1066 (2006). Los ejemplos de los cánceres que desarrollan los perros de modo natural incluyen: el linfoma no-Hodgkin, osteosarcoma, melanoma, carcinoma prostático, carcinoma pulmonar, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma mamario y carcinoma de tejidos blandos. *Abreviado*. Se ha notificado que los ensayos en perros domésticos ayudan a definir mejor la seguridad y la actividad de nuevos agentes anticancerígenos, asisten a la identificación de biomarcadores relevantes asociados con la respuesta o exposición a estos fármacos anticancerígenos y pueden permitir el desarrollo racional de estrategias combinadas para mejorar el éxito de estos nuevos fármacos en ensayos clínicos en seres humanos. *Abreviado*. Candolfi *et al.* describen el uso de la transferencia génica mediada por adenovirus en perros que desarrollan espontáneamente glioblastoma multiforme (GBM) (Candolfi M *et al.*, Neurosurgery 60: 167-178 (2007)). Paolini *et al.* notificaron que el Consorcio Comparativo de Ensayos Oncológicos (COTC) evaluó un vector fágico AAV dirigido que administra factor de necrosis tumoral (RGD-A-TNF) a las αV integrinas en el endotelio tumoral. PLoS ONE 4(3): e4972 (2009).

El documento EP 0091784 divulga el análisis de diversos agentes quimioterapéuticos en perros con diversos tumores espontáneos. Rassnick K *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol. 62:881-891 (2008) divulga la evaluación *in vitro* e *in vivo* del calcitrol y el cisplatino combinado en perros con tumores de origen espontáneo. Thamm D *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 52:473-480 (2003) divulga la terapia inmunogénica intralesional de complejos lípido-citocina/superantígeno para los tumores caninos espontáneos. Spugnini E *et al.*, J. Trans. Med. 5:48 (2007) divulga patrones de respuesta tumoral en pacientes de cáncer canino y felino tratados con electroquimioterapia para la normalización de este tratamiento en mascotas y seres humanos.

La invención descrita en el presente documento proporciona tecnologías de plataforma para estudiar el cáncer de origen espontáneo que pueden traducirse en tratamientos terapéuticos y métodos diagnósticos.

65

Sumario breve de la invención

La invención proporciona tecnologías de plataforma para investigar las rutas biológicas, los efectos (por ejemplo, efectos sinérgicos) de diversas combinaciones de agentes que afectan a las rutas biológicas y/o fisiológicas, que subyacen a los mecanismos de acción, los participantes biológicos en condiciones fisiológicas complejas y otros parámetros que pueden ser útiles para el desarrollo de agentes para el tratamiento, diagnóstico o profilaxis del cáncer.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para identificar una combinación de agentes anticancerígenos con efectos sinérgicos que comprenden: (1) administrar uno o más agentes anticancerígenos a un animal de compañía con un cáncer de origen espontáneo; (2) controlar al animal de compañía con respecto a un efecto biológico y/o fisiológico; y (3), identificar una combinación de agentes anticancerígenos con efectos sinérgicos donde los efectos biológicos y/o fisiológicos sean sinérgicos, donde los agentes anticancerígenos comprenden bisfosfonatos y CpG catiónicas. En una realización, los agentes son clodronato y CpG catiónicas.

En cualquiera de los aspectos o realizaciones de esta invención, el animal de compañía es un perro. El perro puede ser un perro de raza pura o un perro mestizo. El perro puede tener unos antecedentes genéticos homogéneos o unos antecedentes genéticos heterogéneos.

En cualquiera de los aspectos o realizaciones de esta invención, el animal de compañía es un gato. El gato puede ser de raza pura o un mestizo. El gato puede tener unos antecedentes genéticos homogéneos o unos antecedentes genéticos heterogéneos.

Se describe un sistema modelo de animal de compañía para identificar una modalidad de tratamiento para el tratamiento en seres humanos que comprende una combinación de composiciones que tiene una probabilidad más alta de éxito para identificar la modalidad de tratamiento después en un modelo convencional.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para identificar un agente anticancerígeno que comprende: (a) procurar un sistema de modelo animal para ensayar el agente donde el sistema de modelo de animal de compañía tiene un cáncer de origen espontáneo; (b) administrar el agente al sistema de modelo de animal de compañía; (c) controlar más de un antígeno de cáncer en el sistema de modelo de animal de compañía con respecto a sus efectos biológicos y/o fisiológicos; y (d) identificar el agente como anticancerígeno basándose en los efectos biológicos y fisiológicos. En una realización, el animal de compañía es un perro o un gato. En otra realización, el antígeno de cáncer no es un antígeno de glioblastoma multiforme.

Se describen métodos para dirigir múltiples antígenos asociados o sospechosos de estar asociados con cáncer en un ser humano que comprenden: (a) procurar un sistema de modelo de animal de compañía para ensayar el agente donde el sistema de modelo de animal de compañía tiene un cáncer de origen espontáneo; (b) administrarle al sistema de modelo de animal de compañía uno o más agentes que sean sospechosos de tener efectos anticancerígenos; (c) controlar los efectos del agente en el sistema de modelo de animal de compañía; y (d) administrar el mismo agente al ser humano si el agente tiene un efecto anticancerígeno en el sistema de modelo de animal de compañía.

Se describen métodos para mejorar los tiempos y/o el coste para obtener la aprobación reguladora de un agente para una enfermedad que comprende: (a) identificar un sistema de modelo de animal de compañía para la enfermedad en el que el sistema de modelo de animal de compañía tiene una versión de origen espontáneo de la enfermedad; (b) administrar el agente al sistema de modelo de animal de compañía; (2) controlar al animal con respecto a los efectos biológicos y fisiológicos; (d) determinar los efectos del agente sobre la enfermedad y (e) documentar los efectos de los agentes en los medios que son adecuados para la remisión a una agencia reguladora.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa los resultados que muestran que la administración i.v. una vez a la semana de 200 ul de CL a ratones C57B1/6 con tumores (sarcoma) MCA-205 s.c. establecidos produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

La Figura 2 representa resultados que muestran un perro con un STB tratado con una serie de tratamientos con CL solamente, experimentó una regresión significativa del tumor espontáneo que comenzaba después de la tercera administración de CL.

La Figura 3 representa los resultados que muestran que veinticuatro horas después de la administración i.v. de CL en los ratones portadores de tumores, en los que se enumeraron las CMS CD11b⁺/Gr-1⁺ en bazo, sangre y tejidos tumorales y en los que se dio un empobrecimiento significativo de CMS en sangre.

La figura 4 representa los resultados que muestran que la actividad antitumoral de CL se eliminó casi completamente en los ratones CD8^{-/-}, mientras que la actividad de CL se inhibió solamente de modo parcial en los ratones CD4^{-/-}. Los controles también incluyeron ratones tratados con PBS que contenía liposomas (control lip).

La figura 5 representa los resultados de los experimentos que ensayó si el empobrecimiento de las CMS usando CL podría potenciar las respuestas de la vacuna, usando respuestas inmunitarias humorales como lectura.

5

Descripción detallada de la Invención

10 La invención proporciona tecnologías de plataforma para estudiar diversos aspectos de las rutas biológicas, condiciones fisiológicas y/o respuestas, y mecanismos subyacentes de acción para el cáncer, tal como el cáncer de origen espontáneo. Dicho conocimiento puede usarse además para la medicina translacional para diversos fines, incluyendo, pero sin limitación, el desarrollo de tratamientos, métodos diagnósticos o kits; la identificación de nuevas rutas, identificación de compuestos o agentes (y combinaciones de los mismos) para fines terapéuticos o profilácticos y/o identificación de nuevas dianas de la enfermedad.

15 Generalmente, los animales de compañía con enfermedades de origen espontáneo son útiles para reunir datos sobre diversas modalidades de tratamiento y sus combinaciones. Dado que los animales de compañía no se mantienen en condiciones de laboratorio (es decir, con exposición limitada a factores ambientales diarios, y expuestos a un conjunto de condiciones controladas), el uso de dichos animales es un factor distintivo de los otros estudios (por ejemplo, los estudios con sabuesos) que usan caninos mantenidos en condiciones de laboratorio. Además, las enfermedades no se inducen por reactivos en condiciones de laboratorio, es decir, las enfermedades se desarrollan espontáneamente. Por lo tanto, el beneficio de esta plataforma es que esta refleja más lo que ocurre en seres humanos que los animales de laboratorio a los que se les han inducido el desarrollo de una enfermedad o afección particular.

20 Los animales de compañía no humanos, tales como los perros, desarrollan espontáneamente enfermedades que se asemejan a las enfermedades de los seres humanos. Como tal, el uso de animales de compañía que desarrollan enfermedades de origen espontáneo puede proporcionar beneficios adicionales disminuyendo el tiempo necesario para reunir datos científicos para la aprobación reguladora, disminuyendo el coste asociado con la reunión de dichos datos y aumentando la cantidad de datos científicos que pueden obtenerse. El uso de modelos animales con enfermedades de origen espontáneo permite ensayar uno o más parámetros (tales como el tipo de antígeno(s), combinación de antígenos, combinación de agentes, localización de administración, etc.) que no podrían permitirse de otro modo bajo la normativa de la FDA. Además, también se ayuda a los animales de compañía mediante los descubrimientos potenciales que podrían curar o tratar sus enfermedades de origen espontáneo.

25 Se describe un sistema modelo de animal de compañía como una tecnología de plataforma para identificar una modalidad de tratamiento para el tratamiento en seres humanos que comprende una combinación de composiciones que tiene una probabilidad más alta de éxito para identificar la modalidad de tratamiento que en un modelo convencional. El animal de compañía puede ser cualquier animal que acompañe a los seres humanos, preferentemente expuesto a los mismos factores ambientales (por ejemplo, aire, agua) que sus dueños humanos. En un aspecto, el animal de compañía es un animal cuyo genoma se ha determinado bien parcialmente o completamente. El uso de la información genómica (por ejemplo, al nivel de ácidos nucleicos, proteínas o a nivel metabólico) es útil en estas tecnologías de plataforma. Los ejemplos no limitantes de animales de compañía que comparten factores ambientales similares a sus dueños humanos y tienen su genoma parcialmente o completamente secuenciado incluyen a perros y gatos.

30 El uso de las tecnologías de plataforma descritas en el presente documento puede proporcionar una reducción de 20-50 veces en el tiempo y/o coste para la medicina translacional explotando las sinergias entre múltiples plataformas así como una combinación de múltiples antígenos y cualquier combinación de los mismos. Tal como se describe en más detalle en el presente documento, las tecnologías de plataforma pueden aplicarse a distintos contenidos que tradicionalmente han enfrentado dificultades en los ensayos en seres humanos debido a los costes, las restricciones reguladoras, el tiempo, el tamaño de los ensayos y otros obstáculos en el camino para el avance de la ciencia. Estos contenidos incluyen, pero sin limitación, vacunas (por ejemplo, vacunas tolerizantes, CpG lipídicas catiónicas, detección de quórum y autoinductores en enfermedades infecciosas, multiplexación de patología a partir de muestras biológicas (por ejemplo, orina, saliva, sangre o plasma), técnicas diagnósticas para el diagnóstico rápido y tecnología de multiplexación de marcadores.

55

Técnicas Generales

60 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current*

65

5 Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991) y Short Protocols in Molecular Biology (Wiley & Sons, 1999). Otras referencias útiles incluyen Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill; Morrison *et al.*, eds.); Dubois' Lupus Erythematosus (5ª ed.; D.J. Wallace y B.H. Hahn, eds.); Williams & Wilkins, 1997), Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat (Stephen Ettinger, ed., W.B. Saunders Company; 5ª edición (15 de enero de 2000)); y Kirk's Current Veterinary Therapy XIV (Bonagura *et al.*, Saunders; 14ª edición (10 de julio de 2008)).

Definiciones

10 Tal como se usa en el presente documento, la formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluye las referencias al plural a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, "un" antígeno incluye uno o más antígenos.

15 Un "individuo" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen pero sin limitación, animales de granja, animales deportivos, mascotas, animales de compañía, primates, ratones y ratas. En una realización, un individuo es un ser humano.

20 Un "animal de compañía" es un animal no humano que reside en la misma vivienda que sus propietarios humanos para acompañarlos. Los animales de compañía generalmente están expuestos a los mismos factores ambientales que los seres humanos (por ejemplo, agua, aire, carcinógenos, alérgenos, etc.). Los ejemplos no limitantes de un animal de compañía incluyen perros y gatos. En un aspecto, un animal de compañía no está sometido a condiciones de laboratorio (por ejemplo, con exposición limitada a factores ambientales diarios y expuestos a un conjunto de condiciones controladas).

25 Tal como se usa en el presente documento, las enfermedades "origen espontáneo" u "originadas espontáneamente" (o de origen natural) son enfermedades que implican estados patológicos inducidos en el hospedador. Los estados patológicos inducidos en el hospedador se refieren a algún tipo de respuesta biológica o fisiológica en determinadas circunstancias. En una realización, los estados patológicos inducidos en el hospedador no incluyen los estados inducidos por virus en los que el virus es el agente causante de la transformación. En otra realización, "de origen espontáneo" incluye afecciones biológicas y/o fisiológicas o respuestas que se llevan a cabo mediante virus. Por ejemplo, se puede inducir que un ratón o una rata tengan cáncer inyectándole al ratón o a la rata determinados agentes químicos. No se consideraría que el ratón o la rata afectada por cáncer tiene un "cáncer de origen espontáneo".

35 "Sinergia" tal como se usa para describir los efectos biológicos y/o fisiológicos de una combinación de agentes o modalidades de tratamiento se refiere a uno o más efectos que son mayores que el aditivo de cada agente o modalidad de tratamiento por sí misma. Por ejemplo, si la administración de un agente da como resultado un aumento del 10 % de los anticuerpos y la administración de otro agente da como resultado un aumento del 15 % de los anticuerpos, entonces un efecto sinérgico sería mayor del 25 % de la respuesta de anticuerpos. En algunas realizaciones, un efecto sinérgico es el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % mayor que el efecto aditivo. En otras realizaciones, un efecto sinérgico es el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % mayor que el efecto aditivo. En otras realizaciones, un efecto sinérgico puede ser un aumento de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces por encima del efecto aditivo.

45 "Sinergia" también puede usarse para describir una disminución de los efectos biológicos y/o fisiológicos (por ejemplo, la respuesta autoinmunitaria) además de un aumento en los efectos biológicos y/o fisiológicos (por ejemplo, la producción de anticuerpos). Por ejemplo, si la administración de un agente da como resultado una disminución de la respuesta autoinmunitaria del 10 % (por ejemplo, los anticuerpos antinucleares para el lupus eritematoso sistémico) y la administración de otro agente da como resultado una disminución del 15 %, entonces un efecto sinérgico sería un descenso de más del 25 % de la respuesta autoinmunitaria. En algunas realizaciones, un efecto sinérgico es el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % menor que el efecto aditivo. En otras realizaciones, un efecto sinérgico es el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % menor que el efecto aditivo. En otras realizaciones, un efecto sinérgico es el 125 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, o 500 % menor que el efecto aditivo. En otras realizaciones, un efecto sinérgico puede ser un aumento de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces por encima del efecto aditivo.

60 "Agente" puede referirse a cualquier composición de material, bien sea de origen natural o sintético. Los ejemplos no limitantes de un agente incluyen: moléculas pequeñas, anticuerpos, proteínas de origen natural y fragmentos de las mismas (por ejemplo, receptores solubles como Axl, EGF o VEGF u otros implicados con los factores de crecimiento), proteínas recombinantes y fragmentos de las mismas, moléculas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión), moléculas sintéticas, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono.

65 "Efecto Biológico y/o fisiológico" se refiere al efecto de un agente en los parámetros biológicos o parámetros fisiológicos de un individuo. Los ejemplos no limitantes de parámetros biológicos incluyen: el perfil y/o la producción

de citocinas, respuesta inmunitaria, parámetros inmunitarios tales como la respuesta de anticuerpos, las respuestas Th1 o Th2 o Th17, el perfil genómico y sus cambios, el perfil antigénico y sus cambios, los perfiles lipídicos, los perfiles de ácidos grasos y colesterol y los perfiles de toxicidad. Los ejemplos no limitantes de parámetros fisiológicos incluyen parámetros asociados con un sistema, por ejemplo, el sistema cardiovascular. Dichos parámetros cardiovasculares pueden incluir, pero sin limitación, la salud cardíaca, la oclusión de la arteria pulmonar, las presiones de perfusión coronaria; el gasto cardíaco, pulmonar, las resistencias vasculares sistémicas. En otras realizaciones, los parámetros fisiológicos pueden incluir, pero sin limitación, las mediciones de gases sanguíneos y saturación, el suministro de oxígeno, la utilización de oxígeno, la capacidad renal y la capacidad de procesamiento y funcional de los órganos (por ejemplo, el hígado para las toxinas, el páncreas para la producción de insulina, etc.).

"Enfermedad" se refiere a una condición anormal de un individuo que puede alterar las funciones corporales, y que se asocia comúnmente con síntomas específicos. Esta puede estar causada por factores externos, tales como patógenos invasores, o puede estar causada por disfunciones internas, tales como enfermedades autoinmunitarias. "Enfermedad" también abarca los diversos estados y grados de cada enfermedad. Por ejemplo, el desarrollo de un crecimiento maligno es un estado patológico del cáncer. La metastasis es otro estado patológico del cáncer. No todos los síntomas y/o signos notificados por estar asociados con el desarrollo de la enfermedad tienen que estar necesariamente presentes en un individuo para cualquier enfermedad dada.

"Antígeno" tal como se usa en el presente documento, se refiere en su amplio sentido a cualquier sustancia que puede reconocer el sistema inmunitario de un organismo. En un aspecto, los antígenos pueden inducir la producción de anticuerpos. Los antígenos son típicamente proteínas o polisacáridos. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, partes (cubiertas, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias y toxinas) de bacterias, virus y otros microorganismos. Los antígenos no necesariamente tienen que provocar una respuesta inmunitaria solamente por sí mismos. Los antígenos abarcan a los inmunógenos, los cuales no provocan una respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta de anticuerpos). Los tipos de antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos exógenos (antígenos que han entrado en el organismo a partir del exterior, por ejemplo mediante inhalación, ingestión o inyección), antígenos endógenos (antígenos que se han generado dentro de la célula, por ejemplo, como resultado del metabolismo celular normal, o debido a una infección por virus o bacterias intracelulares), autoantígenos, antígenos tumorales y antígenos alérgicos.

Un "autoantígeno" es habitualmente una proteína o complejo de proteínas normal (y algunas veces un ADN o ARN) que se reconoce por el sistema inmunitario de pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria específica. Estos antígenos no deben, en condiciones normales, ser la diana del sistema inmunitario, pero, debido principalmente a factores genéticos y ambientales, la tolerancia inmunológica normal para dicho antígeno se ha perdido en estos pacientes.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, preferentemente incluyendo resultados clínicos. Por ejemplo, en el contexto de la esta invención, un resultado deseado sería la detención del crecimiento de células cancerosas. El tratamiento no necesariamente requiere que la enfermedad se erradique o que el individuo que tiene la enfermedad se cure.

"Recibir tratamiento" incluye el tratamiento inicial y/o la continuación del tratamiento.

"Terapia" incluye tanto la terapia profiláctica (es decir, antes de la aparición de la enfermedad) como el tratamiento terapéutico (es decir, después de la aparición de la enfermedad).

"Efecto beneficioso" se refiere a un efecto biológico o fisiológico sobre el individuo (por ejemplo, ser humano o animal de compañía) que mejora el bienestar del individuo. Los ejemplos no limitantes de un efecto beneficioso incluyen: la reducción de los tumores o ganglios cancerosos, la reducción del número de células malignas, la producción de anticuerpos aumentada contra el cáncer o los patógenos, la secreción de citocinas que ayuden a la eliminación de las células cancerosas y/o los patógenos, la disminución de la cantidad de reacción inmunitaria contra automoléculas, la reducción de la respuesta autoinmunitaria, la mitigación de los síntomas de una enfermedad, la mitigación del dolor no deseado en un individuo, el aumento del nivel de comodidad de un individuo, el aumento de la robustez del sistema inmunitario del individuo y la reconstitución del sistema inmunitario de un individuo.

Tal como se usa en el presente documento, "combinación" se refiere a todas las variaciones posibles para la combinación de cualquier agente, antígeno, composición, compuesto, adyuvante, etc. con los demás. Esto incluye el uso de más uno de cualquiera de uno de los agentes, antígenos, composiciones, adyuvantes y similares dentro de su propio grupo (por ejemplo, agentes múltiples) o con otros grupos. Por ejemplo, la "combinación" contempla el uso de un agente con un adyuvante o dos composiciones con varios adyuvantes.

Composiciones de Modalidades de Tratamiento

La invención proporciona tecnologías de plataforma que utilizan un sistema de modelo de animal de compañía de cáncer de origen espontáneo para investigar los aspectos del cáncer en seres humanos. Los modelos de animales de compañía que pueden usarse incluyen cualquier animal que resida con seres humanos. De este modo, el animal

- de compañía está expuesto a factores ambientales similares que sus co-habitantes humanos. Dichos factores ambientales incluyen, pero sin limitación, respirar el mismo aire, beber la misma agua, la exposición a los mismos contenidos dentro del domicilio (por ejemplo, alfombras, limpiadores, etc.). Al contrario que los animales que se usan típicamente para los experimentos (por ejemplo, ratones y ratas), los animales de compañía se exponen a los mismos factores que un ser humano y, como tales, proporcionan unos antecedentes más parecidos para la correlación de las enfermedades y/o afecciones fisiológicas humanas. También puede usarse cualquiera de los tratamientos que sean beneficiosos para los seres humanos para ayudar al animal de compañía, lo cual incluye no solamente tratar la enfermedad y/o afección fisiológica, sino también mejorar su calidad de vida.
- 5
- 10 Se ha descrito que el examen de múltiples modalidades se lleva a cabo un sistema de modelo canino. En una realización, múltiples modalidades puede referirse al uso de múltiples antígenos en el sistema. El estudio de un solo antígeno podría no proporcionar una revelación suficiente en un sistema biológico para generar una respuesta inmunitaria eficaz. Por ejemplo, la identificación de un solo antígeno asociado con cáncer de próstata, por ejemplo, fosfatasa ácida prostática, puede montar una respuesta inmunitaria pero la identificación de otros antígenos proporcionarían una respuesta inmunitaria adicional, incluso sinérgica, para combatir el cáncer de próstata. El estudio
- 15 de múltiples antígenos en los ensayos clínicos en seres humanos no es viable debido a las restricciones reguladoras (por ejemplo, la aprobación por la FDA), el coste, el tiempo, y/u otras barreras biológicas. A este respecto, el uso de un sistema de modelo canino es útil para el examen de múltiples antígenos dado que los perros desarrollan espontáneamente cáncer de próstata. Un experto en la materia puede usar el sistema de modelo canino para examinar múltiples antígenos, por ejemplo, antígenos de cáncer, para identificar nuevos antígenos que puedan usarse como dianas (por ejemplo, anticuerpos contra el antígeno, moléculas pequeñas, etc.). Además, el uso de un sistema de modelo canino puede ayudar a identificar nuevas rutas y/o nichos biológicos a los que se asocia el antígeno y que pueden utilizarse como base para terapias adicionales.
- 20
- 25 Se ha descrito que múltiples modalidades puede referirse al uso de uno o más antígenos más uno o más adyuvantes. El término "adyuvante" se conoce bien en la técnica. Este se refiere comúnmente a agentes farmacológicos o inmunológicos que pueden modificar el efecto de otros agentes (por ejemplo, fármacos o vacunas) aunque tienen poco si es que tienen algún efecto directo cuando se dan por sí mismos. Un adyuvante puede ser un adyuvante inmunológico, que puede modificar o aumentar los efectos de una vacuna estimulando el sistema
- 30 inmunitario para responder a la vacuna más vigorosamente, y proporcionando por lo tanto una inmunidad aumentada para una enfermedad particular. Los ejemplos no limitantes de los adyuvantes inmunológicos incluyen: aluminio, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante de Ribi, sales de aluminio y polinucleótidos inmunomoduladores (por ejemplo, polinucleótidos que contienen CpG). Un adyuvante también puede ser un adyuvante farmacéutico que tiene poco o ningún efecto farmacológico por sí mismo, pero puede aumentar la eficacia o potencia de otros fármacos cuando se dan al mismo tiempo. Un ejemplo no limitante de esto es la cafeína, que tiene un efecto analgésico mínimo por sí misma, pero que puede tener un efecto adyuvante cuando se da con paracetamol (acetaminofeno). Adyuvante también puede referirse a terapia adicional en el contexto del cáncer, por ejemplo, en la quimioterapia. En este contexto, la terapia adyuvante se refiere al tratamiento adicional, que se da habitualmente después de la cirugía cuando se ha eliminado toda la enfermedad detectable, pero cuando sigue
- 35 habiendo un riesgo estadístico de recaída debido a enfermedad oculta. En un ejemplo no limitante, puede darse radioterapia o quimioterapia como tratamiento adyuvante después de la cirugía para un cáncer de mama.
- 40
- El uso de "adyuvantes inversos" está abarcado por el término "adyuvante". Los adyuvantes inversos pueden tener efectos tolerizantes cuando se usan con una vacuna tolerizante (*véase, por ejemplo, Ho et al, J. Immunology 175: 6226-6234, 2005*). Un ejemplo de un adyuvante inverso es el oligonucleótido de GpC que tiene efectos supresores al contrario que con oligonucleótidos de CpG, que tienden a tener propiedades inmunoestimuladoras (*véase, por ejemplo, Ho et al, J. Immunology 171: 4920-4926, 2003*).
- 45
- La combinación de diversos antígenos y adyuvantes y su efecto sobre diversas enfermedades de origen espontáneo, ha sido difícil de estudiar en ensayos en seres humanos por los motivos que se explican anteriormente. El uso de ratones o ratas como modelos animales no proporciona información igual de precisa que el uso de un sistema de modelo canino de enfermedades de origen espontáneo dado que la traducción genética a los seres humanos y la progresión de la enfermedad no es tan paralela como cercanamente lo es en los perros con respecto a los de seres humanos. (Tsai *et al.*, *Mamm. Genome*, 18:444-451 (2007). Como tal, el uso de un sistema de modelo canino es una tecnología de plataforma para examinar las enfermedades de origen espontáneo que permite que un experto en la materia identifique una modalidad de tratamiento con una mayor probabilidad de éxito que usando un modelo de ratón convencional en el que se inducen las enfermedades.
- 50
- 55
- 60 Pueden usarse diversos tipos de adyuvantes usando el sistema de modelo canino que se divulga en el presente documento. En una realización, los adyuvantes actúan a través de los agonistas del receptor similar a toll (TLR) pueden estudiarse usando la tecnología de plataforma del sistema de modelo canino de enfermedades de origen espontáneo. Diversos TLR incluyen, pero sin limitación, TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9. Un ejemplo son los compuestos que contienen CpG que actúan a través de los TLR. Dichos adyuvantes se han ensayado en el contexto de la hepatitis B. Otros ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden estudiarse incluyen la hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) y MF59.
- 65

En otro aspecto, las tecnologías de plataforma que se describen en el presente documento permiten que un experto en la materia explore el uso de múltiples modalidades contra unos antecedentes genéticos heterogéneos. Un experto en la materia apreciará que existen diversos grados de heterogeneidad y homogeneidad en los antecedentes genéticos. En un extremo del espectro, los antecedentes genéticos homogéneos se observan comúnmente en animales clonados o animales tales como los ratones que se han cruzado durante muchas generaciones de modo que sus antecedentes genéticos son los mismos que en el siguiente ratón.

Más abajo en el espectro están los animales heterogéneos (por ejemplo, con menos grado de homogeneidad que los animales clonados), tales como los perros de raza pura. Aunque son de raza pura, los perros tienen un código genético ligeramente distinto de cualquier otro pero aún retienen los mismos rasgos morfológicos que los caracterizan como pertenecientes a una raza pura particular. Los perros son únicos entre las especies de mamíferos por que pueden mostrar diferencias en los rasgos morfológicos (tales como la estatura, el peso, la forma) y aún pueden dentro de sus cruzamientos, mostrar rasgos que son hereditarios dentro de un intervalo estrecho. Por ejemplo, los perros chihuahua de raza pura miden generalmente +/- 11,24 cm de un hombro al otro. Ostrander *et al.*, Am J Hum Genet 61:475-480 (1997). Incluso más abajo del espectro, están los perros incluso más heterogéneos que no son de raza pura, sino que son mestizos. En una realización, los animales heterogéneos no incluyen a los ratones diabéticos no obesos (NOD). Es en ese contexto de antecedentes genéticos heterogéneos contra el que se exploran las distintas modalidades de tratamiento. La naturaleza heterogénea de los perros no permite necesariamente que un experto en la materia prediga *a priori* cual será la respuesta biológica, e incluso más aún en el caso donde se utilizan múltiples modalidades de tratamiento (por ejemplo, múltiples antígenos). Lo anterior es igualmente aplicable con otros animales de compañía tales como los gatos.

Ventajas de Usar un Modelo de Enfermedad de Origen Espontáneo

El uso de un modelo de enfermedad de origen espontáneo es beneficioso en diversos aspectos. En un aspecto, el sistema inmunitario del modelo de la enfermedad se mantiene relativamente intacto en comparación con el modelo animal de enfermedad donde se ha inducido que el animal tenga la enfermedad. En este último caso, la inducción artificial de enfermedades deja fuera de juego el equilibrio del sistema inmunitario, causa que el sistema inmunitario (incluyendo diversos tipos de células inmunitarias tales como las células T, células B, neutrófilos, macrófagos, células T reguladoras, células NK, células NKT) y las interacciones entre las células inmunitarias y diversas ramas del sistema inmunitario se perturben por la inducción artificial de enfermedades. Por consiguiente, la invención proporciona una tecnología de plataforma que permite el estudio del cáncer sin la desregulación inmunitario asociada con la inducción artificial de la enfermedad. Esto proporciona hallazgos con mayor significado que facilitan el descubrimiento y/o la identificación de nuevas rutas, mecanismos de acción, participantes biológicos (por ejemplo, receptores celulares o tipos celulares) en estas rutas o mecanismos y entender adicionalmente los fundamentos del cáncer.

Se describe el uso de la tecnología de plataforma para la identificación de uno o más biomarcadores asociados con diversos estados patológicos y enfermedades. En algunos casos, un biomarcador puede referirse a la presencia o ausencia de uno o más genes o proteínas, diversas isoformas de los genes o el corte y empalme génico y su(s) producto(s), polimorfismos nucleotídicos puntuales, perfiles de expresión génica, perfiles proteómicos o perfiles metabolómicos. En algunos ejemplos no limitantes, se usan marcadores multiplexos para la exploración, estadificación, imagen, diagnóstico y/o control de la respuesta a diversas terapias. Por ejemplo, se contemplan los cambios para la expresión de uno o más genes, cambios metabolómicos y epigenéticos. En un ejemplo no limitante, los patrones de metilación en los chips génicos pueden usarse para estudiar los patrones metilación normal frente a los anormales para diversas enfermedades/estados patológicos. Otro ejemplo no limitante es el uso de matrices magnéticas que pueden alojar múltiples biomarcadores (por ejemplo, 15-18 biomarcadores) y que son detectables en bajas cantidades (por ejemplo, 1 pg/ml). Otro ejemplo no limitante es el uso de aptámeros donde pueden evaluarse cientos de biomarcadores simultáneamente o casi simultáneamente. Un experto en la materia puede utilizar la exploración, estadificación, imagen, diagnóstico y/o control en combinación con protocolos de tratamiento y el refinado de cualquiera de las terapias que se contemplan. Un experto en la materia, por ejemplo, un médico, puede modificar la terapia de modo que se prevenga, se retrase el desarrollo de, se mejoren los síntomas de o se trate la enfermedad o afección fisiológica más eficazmente.

Cáncer

El uso de animales de compañía con cáncer de origen espontáneo permite no solamente que un experto en la materia busque curas duraderas para los animales de compañía sino también el uso del animal de compañía como un modelo para el estudio de los aspectos científicos del cáncer (incluyendo los cánceres de origen espontáneo) en seres humanos, que puede conducir a descubrimientos de tratamientos y terapias para diversos tipos de cánceres para la humanidad.

Las tasas de incidencia de los cánceres de seres humanos y de animales de compañía varían considerablemente. En algunos casos, los cánceres humanos no se encuentran comúnmente en mascotas y la oncología comparativa no es práctica. En otros casos, los tumores en los animales de compañía se parecen mucho a sus contrapartes en seres humanos y en algunos casos pueden darse más frecuentemente, proporcionando la oportunidad para estudiar

enfermedades que son raras en los pacientes humanos de cáncer.

Los animales de compañía tales como los perros desarrollan diversos tipos de cánceres de origen espontáneo. Los cánceres comunes incluyen, pero sin limitación, cáncer de hueso (por ejemplo, osteosarcoma), linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin), hemangiosarcoma, otros sarcomas; cáncer de mama, cáncer testicular, cáncer de células mastocíticas, cáncer nasosinusal, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, melanoma, leucemia, cáncer de cerebro, carcinoma pulmonar y carcinoma de tejidos blandos. Algunas razas desarrollan determinados cánceres con más frecuencia que otras razas. Por ejemplo, los hemangiosarcomas, un cáncer agresivo que se origina en los vasos sanguíneos, se observa con más frecuencia en los pastores alemanes, los Golden Retriever, los Boxer y los Setter ingleses que en otras razas. En un aspecto, un experto en la materia puede observar las diferencias en la progresión del cáncer cuando se realizan procedimientos biológicos distintos a los que se aplicarían normalmente en un animal de compañía. Por ejemplo, la progresión del cáncer de próstata puede observarse en perros que han sido castrados y compararse con la progresión del cáncer de próstata con perros cuyos propietarios eligieron no castrarlos.

En un aspecto, el uso de perros de raza pura permite el estudio de unos antecedentes genéticos más homogéneos y una comparación con perros mestizos con unos antecedentes genéticos heterogéneos. El uso de diversos antecedentes genéticos de los animales de compañía, tales como los perros, permite la identificación de diversos antígenos o biomarcadores que se asocian con cáncer. La información resultante obtenida de dichos estudios puede traducirse en diagnósticos o terapias para seres humanos que usan antígenos como dianas para el descubrimiento de fármacos o la inmunoterapia y/o usando biomarcadores en técnicas de imagen.

Los animales de compañía con cáncer de origen espontáneo pueden usarse para examinar los efectos de una combinación de agentes anticancerígenos para identificar una combinación que produce efectos sinérgicos. La combinación de agentes puede ser de dos o más agentes, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 agentes. Los agentes pueden darse al mismo tiempo o en dos o más administraciones. La dosificación de cada agente puede ser la misma o variar, especialmente cuando se usa un grupo de animales de compañía con cánceres de origen espontáneo donde un intervalo de dosificación de los agentes ensayados puede indicar que combinación da como resultado la respuesta biológica más eficaz.

Los agentes anticancerígenos de la invención comprenden bisfosfonatos y CpG catiónicas. Pueden usarse diversas clases de agentes anticancerígenos. Los ejemplos no limitantes incluyen: agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de topoisomerasa, podofilotoxina, anticuerpos (por ejemplo, monoclonales o policlonales), inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib mesilato (Gleevec® o Glivec®), tratamientos hormonales, receptores solubles y otros antineoplásicos.

Los agentes alquilantes pueden alquilar muchos grupos funcionales nucleófilos en condiciones presentes en las células. Cisplatino y carboplatino, y oxaliplatino son agentes alquilantes. Estos alteran la función celular formando enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y grupos fosfato en moléculas biológicamente importantes.

Los anti-metabolitos se parecen a la purina ((azatioprina, mercaptopurina)) o pirimidina e impiden que estas sustancias se incorporen en el ADN durante la fase "S" del ciclo celular, deteniendo su desarrollo y su división normal. También afectan a la síntesis de ARN.

Los alcaloides y terpenoides vegetales derivan de plantas y bloquean la división celular impidiendo la función de los microtúbulos. Dado que los microtúbulos son vitales para la división celular, sin ellos, la división celular no puede ocurrir. Algunos ejemplos no limitantes son los alcaloides de la vinca y los taxanos.

Los alcaloides de la vinca se unen específicamente a sitios en la tubulina, inhibiendo el ensamblaje de la tubulina dentro de los microtúbulos (fase M del ciclo celular). Los alcaloides de la vinca incluyen: vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina.

La podofilotoxina es un compuesto de origen vegetal del que se ha notificado que ayuda con la digestión así como se usa para producir otros dos fármacos citostáticos, el etopósido y el tenipósido. Estos impiden que la célula entre en la fase G1 (el comienzo de la replicación del ADN) y la replicación del ADN (la fase S).

Los taxanos como grupo incluyen el paclitaxel y el docetaxel. El paclitaxel es un producto natural, originalmente conocido como Taxol y que se derivó primero de la corteza del árbol tejo del Pacífico. El docetaxel es un análogo semisintético del paclitaxel. Los taxanos potencian la estabilidad de los microtúbulos, impidiendo la separación de los cromosomas durante la anafase.

Los inhibidores de topoisomerasa también son otra clase de agentes anticancerígenos que pueden usarse. Las topoisomerasas son enzimas esenciales que mantienen la topología del ADN. La inhibición de las topoisomerasas de tipo I o de tipo II interfiere tanto con factores de transcripción como de replicación del ADN y perturbando el superenrollamiento apropiado del ADN. Algunos inhibidores de la topoisomerasa de Tipo I incluyen las

camptotecinas: irinotecan y topotecan. Los ejemplos de inhibidores de tipo II incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido. Estos son derivados semisintéticos de epipodofilotoxinas, alcaloides que se originan naturalmente en la raíz del podofolio americano (*Podophyllum peltatum*).

- 5 Los antineoplásicos incluyen los inmunosupresores dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, bleomicina, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida. Los compuestos antineoplásicos funcionan generalmente modificando químicamente el ADN de una célula.

10 Los receptores solubles pueden incluir la parte extracelular de los receptores conocidos por su unión a factores de crecimiento y especialmente los factores de crecimiento que se asocian con el cáncer. Los ejemplos no limitantes son: Axl, VEGF y EGF. Los receptores solubles pueden ser receptores recombinantes/sintéticos o de origen natural (por ejemplo, una preparación purificada o concentrada). La parte extracelular de los receptores también puede fusionarse para promover la semivida y otros parámetros farmacocinéticos deseables para crear proteínas de fusión.

15 Osteosarcoma

El osteosarcoma es una forma relativamente rara de cáncer que afecta a un porcentaje desproporcionado de niños, con una incidencia anual de 900 nuevos pacientes al año incluyendo 400< de 20 años de edad. Aunque es raro, es la 6ª forma de cáncer más frecuente en niños por debajo de la edad de 15, aproximadamente el 3 % de todos los cánceres infantiles. El cuidado convencional actual es la amputación o la cirugía ortopédica de recuperación de extremidades combinada con la quimioterapia (dosis alta de metotrexato con un rescate de leucovorina, cisplatino intraarterial, adriamicina, ifosfamida, etopósido muramil tripéptido). Las tasas de supervivencia han mejorado desde los 1960 cuando la única opción de tratamiento era la amputación y solamente del 5-20 % de los pacientes sobrevivían más de dos años, pero a pesar de las mejoras a través de la quimioterapia la tasa de supervivencia para el osteosarcoma sigue estando entre las más bajas dentro de los cánceres pediátricos. La tasa de supervivencia actual a los 5 años para los pacientes de osteosarcoma no metastático está > 70 % mientras para los pacientes con metástasis la tasa es de aproximadamente el 30 %. El progreso hacia unas opciones de tratamiento mejoradas para esta población joven se ha ralentizado por su incidencia rara y las exposiciones resultantes en pacientes acumulados para los estudios clínicos.

30 Al contrario que la incidencia en seres humanos, el osteosarcoma es un cáncer relativamente común en las razas más grandes de perros (> de 27,18 kilogramos), particularmente en el Gran Danés, el perro lobo y el Rottweiler. La incidencia de osteosarcoma es del 3-4 % de todos los cánceres caninos, afectando a hasta 10.000 perros al año en Norteamérica. El osteosarcoma humano y canino comparte características comunes de distribución anatómica y metástasis. En ambas especies, >75 % de los casos ocurren en los huesos largos (radio distal > húmero proximal; fémur distal > tibia), predominantemente en machos (2:1). La alta tasa metastática en perros (90 %) es comparable a la de seres humanos (80 %), y los sitios de metástasis tienen una jerarquía similar de pulmón>hueso>tejido blando. Además, el osteosarcoma primario y las metástasis son histológicamente indistinguibles entre los pacientes humanos y caninos. Al igual que los seres humanos, los perros también responden al tratamiento con quimioterapia con cisplatino, doxorubicina o carboplatino después de los procedimientos de amputación que produce un tiempo medio de supervivencia de 9-11 meses, una mejora significativa sobre la supervivencia media de 3-4 meses después de la amputación sola. Dada la histología compartida, el patrón metastático y la respuesta a quimioterapia, el osteosarcoma canino ofrece un excelente modelo para ensayar terapias alternativas. Con mayor incidencia y una progresión más rápida, los ensayos clínicos pueden reclutar y completarse más rápidamente en perros, informando de nuevas estrategias terapéuticas tanto para los pacientes humanos como para los caninos.

Sarcomas de Tejidos Blandos

50 Los sarcomas de tejidos blandos son un grupo de diferentes tumores que derivan de tejidos mesenquimales (por ejemplo, tejido conjuntivo, tejido fibroso, músculo). Estos constituyen menos del 1 % de todos los nuevos casos de cáncer al año; en 2006 hubo aproximadamente 9500 nuevos casos diagnosticados en los Estados Unidos, más comúnmente en pacientes más mayores (>50 años de edad) aunque algunos subtipos (por ejemplo, rabdomiosarcoma un sarcoma del músculo esquelético) son más comunes en niños y adolescentes. Los sarcomas de tejidos blandos son, como una clase, más comunes en animales de compañía, representando el 15 % de todos los cánceres subcutáneos en perros y el 7 % en gatos. Con la excepción de los hemangiosarcomas, esta clase de tumores son localmente agresivos pero raramente metastatizan. No obstante, los sarcomas de tejidos blandos tanto en seres humanos como en animales de compañía solamente responden moderadamente a la quimioterapia.

60 Debido a que se parecen a los tumores humanos del mismo origen y se detectan relativamente tarde, proporcionando una masa de tumores mayor para el análisis, los sarcomas caninos de tejidos blancos han servido como modelos para la optimización de estrategias terapéuticas. Los protocolos destinados a aumentar el control local, particularmente los que usan radiación adyuvante, acoplada a menudo con hipotermia, han guiado los nuevos protocolos de tratamiento para los pacientes humanos. El interés en la hipertermia localizada se estimuló por la observación de que el calor podría aumentar la eficacia de la radiación o la quimioterapia. En los estudios de hipotermia local y completa se ensayaron los enfoques farmacológicos para inducir hipertermia tales como los fármacos vasoactivos. Los estudios en perros también han modelado el efecto de la hipertermia sobre la

farmacocinética de los fármacos quimioterapéuticos y ayudaron al desarrollo de biomarcadores de hipoxia y técnicas de imagen pronóstica. Los sarcomas de tejidos blandos en animales de compañía también han servido como modelos para ensayar nuevas formulaciones quimioterapéuticas. Por ejemplo, se ensayó la eficacia del cisplatino de liberación lenta en un polímero biodegradable en sarcoma de tejidos blandos canino, y se ensayó la eficacia de doxorubicina encapsulada en liposomas (Doxil) asociada con vacunas en sarcoma felino.

Hemangiosarcoma

El hemangiosarcoma (HSA) es un tumor de las células endoteliales vasculares caracterizado por una metástasis rápida y extensa. Es raro en seres humanos, constituyendo menos del 1 % de todos los tumores, pero constituye del 5-7 % de todas las malignidades caninas. Asumiendo que es riesgo de cáncer a lo largo de su vida en los perros está en el intervalo del 30-50 % este cáncer puede afectar a de 1,5-2,5 millones de los 72 millones de perros domésticos en los Estados Unidos. El HSA se origina con más frecuencia en el bazo, pero también puede formarse en el hígado, la aurícula derecha del corazón y la piel. Tiende a darse en los perros de mediana edad (> 6 años de edad), con una prevalencia más alta en los perros Boyeros de Berna, los Boxer, los Retriever de pelo liso, los pastores alemanes, los Golden Retriever, los perros de agua portugueses y los Skye Terrier; de acuerdo con una encuesta la incidencia de HSA en los Golden Retriever es casi de 1 en 5. Los HSA caninos parecen ser comparables a los angiosarcomas en seres humanos, y debido a que estos ocurren con una frecuencia mucho mayor pueden resultar un sustituto importante para los ensayos clínicos. La quimioterapia, típicamente las combinaciones de doxorubicina y ciclofosfamidias +/- vincristina, es el enfoque terapéutico más común para el HSA, pero los tiempos medios de supervivencia son solamente de 145-180 días.

Carcinoma Mamario

El cáncer de mama y los tumores de las glándulas mamarias caninos tienen varias similitudes epidemiológicas y fisiológicas. El cáncer de mama es la mayor causa de cáncer en las mujeres norteamericanas, constituyendo casi el 30 % de todos los cánceres, el riesgo de cáncer de mama a lo largo de la vida de las mujeres americanas es del 12 %. Los tumores de las glándulas mamarias (TGM) constituyen el 52 % de todos los tumores en las perras, y ocurren en el 26 % de todos los perros sin esterilizar. Existen similitudes genéticas e histológicas significativas entre el cáncer de mama y los TGM, pero también diferencias clave en la expresión génica y la respuesta a fármacos que complican los esfuerzos para trasladar las estrategias terapéuticas entre especies. Los TGM son dependientes de hormonas; del 50-60 % de estos tumores expresan receptores de estrógenos o receptores de progesterona, y la ovariectomía (esterilización) reduce el riesgo de desarrollar TGM hasta el 0,5 %. El cáncer de mama en seres humanos también es dependiente de hormonas y se trata a menudo con fármacos que afectan a los receptores de estrógenos o de progesterona, pero el antagonista de los receptores tamoxifeno no tiene actividad antitumoral demostrable en perros. Existen también similitudes y diferencias a nivel genéticos. La expresión del oncogén c-erbB-2 se correlaciona con un fenotipo maligno más agresivo en el cáncer de mama en seres humanos. De un modo similar, c-erbB-2 se sobreexpresa en el 74 % de los tumores mamarios caninos, pero en el 0 % de los tumores benignos. Las mutaciones del gen supresor de tumores BRCA1/BRCA2 se asocian con un riesgo aumentado de cáncer de mama en seres humanos. La expresión y variantes de BRCA1 está menos documentada en tumores de glándulas mamarias caninos, aunque informes recientes de las variantes de corte y empalme de BRCA1 en algunos TGM y la regulación positiva de BRCA2 y RAD51 (que interactúa con BRCA1 y BRCA2) en las metástasis de los TGM apuntan a la necesidad de un análisis más exhaustivo de la expresión génica en estos tumores caninos. Tal como con el tratamiento hormonal, la aplicación de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de los TGM es incierta. De acuerdo con algunos artículos de revisión, no se ha probado que ningún agente quimioterapéutico sea constantemente eficaz en los TGM caninos, aunque se han documentado unas pocas respuestas parciales para la doxorubicina y algunas veces se recomienda el cisplatino. A pesar de que hay muchas similitudes, sigue sin estar claro si los TGM caninos son un modelo terapéutico relevante para el cáncer de mama en seres humanos. Estudios adicionales de la expresión génica pueden identificar dianas comunes para cáncer de mama humano y TGM y guiar la aplicación de quimioterapias en seres humanos para el tratamiento del tumor canino.

Melanoma

El cáncer de piel es el más común entre todos los cánceres de los Estados Unidos. Aunque el melanoma es una forma relativamente poco común, constituyendo menos del 5 % de todos los cánceres de piel, es responsable del 75 % de las muertes por cáncer de piel. La tasa de nuevos casos fue relativamente estable a lo largo de los 8 años anteriores, con una estimación de 68.720 casos nuevos en 2009 dando como resultado más de 8.650 muertes. De acuerdo con un informe de la Organización Mundial de la Salud, se dan aproximadamente 48.000 muertes relacionadas con el melanoma alrededor de todo el mundo al año. El riesgo total de melanoma varía con la etnicidad, que varía del 2 % para los caucásicos al 0,5 % para los hispanos y el 0,1 % para los afroamericanos. Las opciones de tratamiento actuales incluyen la resección quirúrgica y la quimioterapia (incluyendo tratamientos simples o combinados con dacarbacina, carmustina, cisplatino, tamoxifeno, vinblastina, temozolomida, y paclitaxel). El melanoma es el cuarto cáncer más común en perros, ocurriendo frecuentemente en la cavidad oral pero también originándose en los dedos, la piel y el ojo. El melanoma oral es, según los informes, el que se observa más comúnmente en perros salchicha, Golden Retriever, caniches y Terrier escoceses. Tal como con los melanomas avanzados en los seres humanos, los melanomas en perros generalmente son resistentes a la quimioterapia y la

radiación, y la metástasis agresiva es la principal causa de insuficiencia del tratamiento y muerte.

Debido a que los melanomas caninos y humanos comparten características comunes de fisiología y respuesta al tratamiento, los ensayos clínicos en perros pueden proporcionar un puente translacional importante para nuevas estrategias de tratamiento para el melanoma humano. Los enfoques inmunoterapéuticos han incluido vacunas autólogas para células tumorales (no modificadas o transfectadas con citocinas inmunoestimuladoras y/o antígenos de diferenciación melanosómica), las vacunas tumorales alogeneicas transfectadas con citocinas inmunoestimuladoras (por ejemplo IL-2, GM-CSF), estimulantes inmunitarios innatos (por ejemplo L-MTP-PE) y vacunas de ADN (por ejemplo, los plásmidos que codifican el ligando de Fas, IL-2, o GM-CSF). Un ensayo clínico aleatorio de L-MTP-PE en el melanoma canino mostró un beneficio del 80 % en la supervivencia a largo plazo en el melanoma en estadio I, pero ningún beneficio en melanoma más avanzado (estadios II y III). En un ensayo clínico en fase I, la vacunación con células de autólogas de melanoma transfectadas con GM-CSF indujo la inflamación localizada y algunas pruebas histológicas de desorganización tumoral. En otros enfoques de vacuna se han inyectado plásmidos de ADN directamente en el melanoma. En un ensayo clínico en fase I de 9 perros con melanoma maligno avanzado de los estadios de II-IV se inyectó ADN que codificaba el antígeno de diferenciación melanosómica tirosinasa en un intento para inducir la inmunidad mediada por células contra las células tumorales que expresan tirosinasa. Esta inmunoterapia indujo una respuesta de anticuerpos en el 33 % de los perros tratados y extendió el tiempo medio de supervivencia hasta 389 días, significativamente más largo que los 1-5 meses de supervivencia conferidos por las terapias convencionales.

Linfoma no Hodgkin.

El linfoma no Hodgkin (NHL) es la sexta mayor causa de muerte por cáncer, con una tasa de incidencia del 3-4 % en los Estados Unidos, dando como resultado unos 66.000 nuevos casos estimados en los EE.UU. en 2009 y una tasa de supervivencia a los 5 años del 50-60 % para los pacientes tratados con quimioterapia. Más del 95 % de los casos nuevos se dan en adultos, con una edad media de aparición de 60 años de edad. El NHL también es relativamente común en perros; su tasa de incidencia es de 25/100.000, constituyendo el 5 % de todas las malignidades y el 83 % de todas las malignidades hematopoyéticas. Aproximadamente del 70-80 % de los casos de NHL canino se originan de los linfocitos B, mientras que los linfomas de células T más raros están asociados con un pronóstico significativamente peor. La prevalencia más alta de NHL se da en los pastores alemanes, los Boxer, los caniches, los sabuesos de Basset y los San Bernardos. La mayor parte de los casos caninos se parecen a los estadios del III-IV de los NHL humanos, y en ausencia de terapia la progresión de la enfermedad es relativamente rápida, dando como resultado la muerte dentro de los 4-6 meses después del diagnóstico. Además de las similitudes histológicas, los NHL caninos y de seres humanos comparten sensibilidades a los fármacos quimioterapéuticos similares, incluyendo la respuesta a doxorubicina, ciclofosfamida y alcaloides de la vinca. Tal como con la práctica clínica en seres humanos, los protocolos de tratamiento más corrientes para el NHL canino emplean múltiples combinaciones alternativas de fármacos, que dan como resultado tasas de respuesta en el intervalo del 86-91 %.

Con una tasa de incidencia de 125/100.000, El NHL es el cáncer más común en gatos, comprendiendo casi un tercio de los tumores felinos. Al contrario que los NHL caninos, una proporción significativa de los NHL felinos es de un linaje de linfocitos T, el resultado de la transformación mediante un retrovirus, el virus de la leucemia felina (VLF_e). Tal como con los perros, el NHL felino es muy quimiorrespondedor-la terapia combinada secuencial alcanza tasas de remisión del 60-70 %. Basándose en sus similitudes con los tumores humanos, tanto el NHL canino como el felino han servido como sustitutos para optimizar los enfoques terapéuticos (véase los Ejemplos).

Cáncer de Vejiga

El cáncer de vejiga es el cuarto cáncer más común en los hombres y el noveno más común en las mujeres en los Estados Unidos. La disparidad en la incidencia, 50.000 hombres y 16.000 mujeres anualmente, puede estar relacionada con el papel principal de los receptores de andrógenos en el desarrollo de los cánceres de vejiga. La mayor parte de los cánceres de vejiga son carcinomas de células transicionales (90 %), originados en las células que recubren el interior de la vejiga; el 10 % restante incluye el carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, sarcoma y carcinoma microcítico. El carcinoma de células transicionales (CCT) también es la forma más común de cáncer de la vejiga urinaria canino, que se parece mucho al CCT invasivo en seres humanos en su histología, comportamiento biológico y respuesta a la terapia. Tal como con otros cánceres, existe una variación en la susceptibilidad con respecto a la raza; por ejemplo, los Terrier escoceses tienen un riesgo 18 veces mayor de desarrollar CCT.

Las opciones de tratamiento para los pacientes de cáncer incluyen cirugía, radiación y quimioterapia. El CCT canino responde a también estos enfoques y ha sido un modelo útil para el desarrollo y la optimización de nuevos agentes terapéuticos. El CCT canino muestra una respuesta modesta a los protocolos basados en platino y antracina, con tasas de respuesta objetivas de ~30 % y TMS de 4-8 meses. El tratamiento con el inhibidor de la ciclooxigenasa piroxicam da como resultado una tasa de respuesta objetiva del 18 % que puede mejorarse adicionalmente mediante la adición de cisplatino, pero con el coste de una nefrotoxicidad inaceptable. Se ha probado que el CCT es un modelo útil para la investigación preclínica de la terapia fotodinámica.

Se describe el uso de la tecnología de plataforma para la identificación de uno o más biomarcadores asociados con cáncer y en algunos casos, un perfil de expresión génica, perfil proteómico o perfil metabolómico de cánceres. La tecnología de plataforma puede usarse para biomarcadores multiplexos. En un ejemplo no limitante, los patrones de metilación en los chips génicos pueden usarse para estudiar los patrones metilación normal frente a los anormales para diversos cánceres. Otro ejemplo no limitante es el uso de matrices magnéticas que pueden alojar múltiples biomarcadores (por ejemplo, 15-18 biomarcadores) y que son detectables en bajas cantidades (por ejemplo, 1 pg/ml). Otro ejemplo no limitante es el uso de aptámeros donde pueden evaluarse cientos de biomarcadores simultáneamente o casi simultáneamente.

En algunos casos de cáncer, se observa un síndrome paraneoplásico. En un aspecto, el síndrome paraneoplásico es una enfermedad o síntoma que es la consecuencia de la presencia de cáncer en el organismo, pero que no se debe a la presencia local de células cancerosas. Estos fenómenos pueden estar mediados por factores humorales (por hormonas o citocinas) excretados por las células tumorales o por una respuesta inmunitaria contra el tumor. Algunas veces los síntomas de los síndromes paraneoplásicos se muestran incluso antes del diagnóstico de una malignidad. Los síndromes paraneoplásicos pueden dividirse en 4 categorías principales: síndromes paraneoplásicos endocrinos, neurológicos, mucocutáneos y hematológicos. En otro aspecto, los síndromes paraneoplásicos pueden ser un grupo de trastornos raros que se desencadenan por una respuesta anormal del sistema inmunitario a un tumor canceroso o un "neoplasma". Sin ligarse a ninguna teoría, en un aspecto, los síndromes paraneoplásicos pueden ocurrir cuando los anticuerpos que luchan contra el cáncer o los glóbulos blancos (por ejemplo, las células T) atacan por error a las células normales del sistema nervioso. Por consiguiente, en una realización, se mantiene el sistema inmunitario intacto de modo que se pueda estudiar el síndrome paraneoplásico de un modo más eficaz.

En otro aspecto de la presente invención, el uso de animales de compañía con cáncer de origen espontáneo que permite el estudio del cáncer es una forma que no se ha inducido a progresar a un estado más grave. En una realización, el cáncer que se estudia es pre-metastático. El uso de fármacos anticancerígenos puede causar inflamación que puede causar que el cáncer progrese de cáncer pre-metastático a cáncer metastático. Usando un modelo animal de enfermedades de origen espontáneo, tal como el cáncer, el cáncer que se examina no se induce adicionalmente para que progrese a una forma a la que no podría haber progresado de otro modo en ausencia de la intervención quimioterapéutica y/o la radiación.

De este modo, el sistema inmunitario del animal se mantiene en un estado tan parecido al natural como sea posible. Esto hace que se estudie el estado biológico o fisiológico del sistema inmunitario de un modo más preciso y, por lo tanto, permite la generación de datos científicos con mayor significado. Estos datos científicos pueden usarse después para la identificación de agentes terapéuticos anticancerígenos.

Medios de Almacenamiento de Lectura Mecánica

Los datos generados usando el sistema de modelo de animal de compañía puede almacenarse en medios de lectura mecánicos. Dichos datos pueden incluir información relacionada con las respuestas biológicas, los parámetros fisiológicos de las respuestas a los agentes que se administran, antígeno(s) que se identifican, estructura de los agentes de se administran, estructura (incluyendo las secuencias, tanto de ácidos nucleicos como de aminoácidos) de antígenos o inmunógenos. Esta información puede almacenarse en medios de lectura mecánicos y utilizarse adicionalmente para generar nuevos agentes que tengan una estructura similar a la de los agentes conocidos que han provocado una respuesta inmunitaria deseable en el sistema de modelo canino. De este modo, se identifican nuevos agentes que tienen efectos biológicos deseados para el uso potencial en el tratamiento de seres humanos.

Se ha descrito que pueden usarse medios de lectura mecánicos para fines educativos, por ejemplo, materiales o manuales de instrucciones. Se han descrito colaboraciones promotoras entre individuos, tales como científicos, filántropos y veterinarios. Dichas colaboraciones pueden fomentarse mediante la diseminación de los datos generados por el uso del sistema de modelo de animal de compañía de enfermedades de origen espontáneo. Esta diseminación puede llevarse a cabo mediante la distribución de estos datos en medios tangibles, por ejemplo, un medio de almacenamiento de lectura mecánica.

Se ha descrito un medio de almacenamiento de lectura mecánica que incluye un material de almacenamiento de datos de lectura mecánicamente que, cuando se usa una máquina programada con instrucciones para usar dichos datos, muestra una representación tridimensional gráfica de cualquiera de las moléculas o complejos moleculares de esta invención que se han descrito anteriormente. En una realización preferente, el medio de almacenamiento de datos de lectura mecánica incluye un material de almacenamiento de datos que está codificado por unos datos de lectura mecánica que, cuando se usa una máquina programada con instrucciones para usar dichos datos, muestra una representación gráfica tridimensional de una molécula o un complejo molecular.

Por ejemplo, un sistema para leer un medio de almacenamiento de datos puede incluir un ordenador que incluye una unidad de procesamiento central ("CPU"), una memoria de trabajo que puede ser, por ejemplo, RAM (memoria de acceso aleatorio (del inglés random access memory) o una memoria de "núcleo", memoria de almacenamiento masivo (tal como una o más unidades de disco o unidades de CD-ROM), uno o más dispositivos de pantalla (por

ejemplo, pantallas de tubo de rayos catódicos ("CRT"), pantallas de emisión de diodo ("LED"), pantallas de cristal líquido ("LCD"), pantallas electroluminiscentes, pantallas fluorescentes de vacío, pantallas de campo de emisión ("FED"), pantallas de plasma, paneles de proyección, etc.), uno o más dispositivos de entrada de usuario (por ejemplo, teclados, micrófonos, ratones, pantallas táctiles, etc.), una o más líneas de entrada, y una o más líneas de salida, cada una de las cuales está interconectada por un bus de sistema bidireccional convencional. El sistema puede ser solamente un ordenador convencional, o puede estar en red (por ejemplo, a través de redes de área local, redes de área más amplia, intranet, extranet, o internet) con otros sistemas (por ejemplo, ordenadores, host, servidores, etc.). El sistema también puede incluir dispositivos informáticos adicionales controlados por ordenador tales como dispositivos electrónicos y aparatos. Esto permite que se agrupen los esfuerzos de colaboración para mejorar los resultados.

El hardware de entrada puede acoplarse al ordenador mediante líneas de entrada y puede implementarse de diversas maneras. Los datos de lectura mecánica de esta invención pueden introducirse por medio del uso de un módem o módems conectados por una línea telefónica o una línea dedicada a datos. Como alternativa o adicionalmente, el hardware de entrada puede incluir unidades de CD-ROM o unidades de disco. Junto con un terminal de pantalla, también puede usarse un teclado como un dispositivo de entrada.

El hardware de salida puede acoplarse al ordenador mediante líneas de salida e implementarse de modo similar mediante dispositivos convencionales. A modo de ejemplo, el hardware de salida puede incluir un dispositivo de pantalla para mostrar una representación gráfica de un sitio activo de esta invención usando un programa tal como QUANTA. El hardware de salida podría incluir también una impresora, de modo que podría producirse una copia impresa, o una unidad de disco para almacenar la salida del sistema para un uso posterior.

En el funcionamiento, una CPU coordina el uso de los diversos dispositivos de entrada y de salida, coordina los accesos de datos a partir de dispositivos de almacenamiento masivo, accesos a y desde la memoria de trabajo, y determina la secuencia de etapas de procesamiento de datos. Puede usarse una serie de programas para procesar los datos de lectura mecánica de esta invención. Dichos programas se explican en referencia a los métodos computacionales del descubrimiento de fármacos tal como se describe en el presente documento. Las referencias a los componentes del hardware del sistema se incluyen siempre que sea apropiado a lo largo de la siguiente descripción del medio de almacenamiento de datos.

Los dispositivos de almacenamiento de lectura mecánica incluyen, pero sin limitación, dispositivos magnéticos, dispositivos eléctricos, dispositivos ópticos, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de dichos dispositivos de almacenamiento de datos incluyen, pero no sin limitación dispositivos de disco duro, dispositivos de CD, dispositivos de disco de vídeo digital, dispositivos de disquete, dispositivos de disco duro extraíbles, dispositivos de disco magneto-óptico, dispositivos de cintas magnéticas, dispositivos de memoria flash, dispositivos de memoria de burbuja, dispositivos de almacenamiento holográfico y cualquier otro dispositivo periférico de almacenamiento masivo. Debe entenderse que estos dispositivos de almacenamiento incluyen el hardware necesario (por ejemplo, unidades, controladores, fuentes de alimentación, etc.) así como cualquier medio necesario (por ejemplo, discos, tarjetas flash, etc.) para permitir el almacenamiento de datos.

Los siguientes ejemplos solamente se proporcionan para fines ilustrativos y no quiere decir que limiten el alcance de la invención de ningún modo.

45 Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de Vehículos de Administración Para el Uso en el Modelo Animal de las Enfermedades de Origen Espontáneo

50 Los vehículos de administración que buscan activamente una célula cancerosa en lugar de una célula normal se prepara usando una propiedad o propiedades biomarcadoras moleculares o físicas que permitan el direccionamiento selectivo. En este ejemplo, el vehículo de administración es un liposoma, una partícula similar a un liposoma o una nanopartícula. Los liposomas pueden estar cargados (por ejemplo, catiónicos) o no cargados. Estos liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas están hechos tanto con como sin receptores o ligandos o biomarcadores.

Los liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas también se hacen portando uno o más virus oncolíticos (por ejemplo, cualquiera de los virus oncolíticos que se explican en "Viral Therapy of Cancer," Harrington, Vile & Pandha, co-editores, Wiley Publishing, 2008). Otros liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas se hacen portando profármacos y dianas de ARNi, con o sin células inmunitarias o agentes quimioterapéuticos o moduladores inmunitarios.

Los profármacos se incorporan en los liposomas, partículas similares a los liposomas o nanopartículas y se usan para ensayarlos en los animales con enfermedades de origen espontáneo. Los ejemplos no limitantes de productos son los agentes terapéuticos para el cáncer y otros fármacos para el cáncer. De un modo similar, las dianas de ARNi se incorporan en los liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas. Para las dianas de ARNi, los

proto-oncogenes y los oncogenes, el/los ARNi sirven para apagar, bloquear o reducir la activación de proto-oncogenes y oncogenes. Para los supresores tumorales, el/los ARNi sirven como un antagonista para encender o aumentar la actividad de los supresores tumorales.

- 5 Los liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas de este ejemplo también se empaquetan con moduladores inmunitarios que incluyen citocinas, quimiocinas, exosomas (partículas pequeñas secretadas por diversas células inmunitarias, tales como los mastocitos, linfocitos T y B, células dendríticas, plaquetas) o factores inmunitarios que promueven la diferenciación/maduración/expansión clonal de las células del sistema inmunitario (por ejemplo, CTLA-4). Los moduladores inmunitarios que se incorporan en los liposomas, partículas similares a
10 liposomas o nanopartículas de este ejemplo también se dirigen a las células inmunosupresoras (por ejemplo, las células T reguladoras o CMSD) para potenciar la inmunoterapia del cáncer.

Los liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas de este ejemplo también se empaquetan con factores que afectan a la epigenética, por ejemplo, la metilación, prenilación, acetilación y desacetilación (por
15 ejemplo, histona acetiltransferasas (HAT) e histona desacetilasas (HDAC)), modificaciones de la cromatina, inactivación X e impronta.

Los liposomas, las partículas similares a liposomas o nanopartículas de este ejemplo están manipuladas con
20 diversas propiedades moleculares que son de ayuda para hacer estos vehículos de administración más eficaces. Los antígenos de cáncer y otros tipos de biomarcadores (marcadores metabólicos) son ejemplos de propiedades moleculares. Véase el Ejemplo 3 para más detalles sobre los antígenos de cáncer. Otra propiedad molecular es la unión a ligandos. Los nichos pre-metastáticos se direccionan usando el ligando apropiado para la unión. De un modo similar, también se direccionan los nichos metastáticos. Algunos marcadores se usan para determinados tipos de
25 cáncer. Por ejemplo, el receptor Axl se usa para el direccionamiento del cáncer pancreático ya que se expresa en >50 % de los cánceres pancreáticos metastáticos. *Cancer Biol Ther.* 8(7):618-26 (2009). Un ejemplo de un marcador metabólico que está inicialmente ligado a glucopéptidos de N que cambian su abundancia tras un tratamiento con AMPc en los glioblastomas. *Proteomics* 9(3):535-49 (2009).

Los liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas de este ejemplo también se manipulan usando
30 diversas propiedades físicas. Los tejidos tumorales tienen un gradiente físico distinto al de un tejido no tumoral. El gradiente de presión del tumor frente a los tejidos no tumorales se mide mediante técnicas convencionales para los expertos en la materia. Los liposomas, partículas similares a liposomas o nanopartículas tal como se describe anteriormente están hechas para el direccionamiento preferente a tumores y regiones que portan tumores del
35 organismo siguiendo el gradiente de presión de los tumores.

Ejemplo 2 Tiempo y Dosificación de Administración del/los Agente(s)

En este ejemplo, se usa como su propio control una cohorte de una población canina homogénea o heterogénea. La
40 dosificación de uno o más agentes en investigación es de aproximadamente una semana entre dosis. El orden de administración entre la terapia del cáncer y el modulador inmunitario varía y se miden y/o se controlan las respuestas biológicas. En un grupo de caninos, la terapia del cáncer se administra primero y después el/los modulador(es) del sistema inmunitario. En otro grupo de caninos, el/los modulador(es) del sistema inmunitario se administra(n) primero y después la terapia del cáncer.

45 En otro grupo de animales, se cambia el orden de administración de los moduladores inmunitarios con o sin un agente de quimiotaxis y después se miden las respuestas biológicas.

Ejemplo 3 Biomarcadores/Antígenos de Cáncer y Caninos

50 Se usan múltiples antígenos de cáncer y/o biomarcadores para los estudios traduccionales en diversas combinaciones entre ellos. Para el osteosarcoma, los antígenos y/o biomarcadores de cáncer que se examinan incluyen pero no se limitan a: el antígeno que se une por los anticuerpos monoclonales TP-1 y TP-3 (que detecta un antígeno que se expresa en las células del osteosarcoma humano), el proto-oncogén *erbB-2* (receptor del factor de crecimiento epidérmico 2/neu humano), vimentina, osteopontina, PCNA, p53, MMP-2 y MMP-9.

55 Para el linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin), los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: el antígeno CD3 (*J Vet Diagn Invest* 5:616-620, 1993), T200 (homólogo del antígeno de diferenciación linfocitaria) (*Can J Vet Res.* 51(1): 89-94, 1987), y el antígeno que se une por el anticuerpo monoclonal de linfoma canino 231 (*Cancer Therapy*, Vol 7, 59-62, 2009).

60 Para el hemangiosarcoma, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: c-kit, CD34, CD133, CD45 (*Exp Hematol.*, 34(7):870-8, 2006), antígeno relacionado con el factor VIII, ICAM-1, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrina (*Research in Veterinary Science*, 81(1): 76-86, 2006), receptores de VEGF 1 y 2, CD31, CD146, y $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrina (*Neoplasia*, 6(2): 106-116, 2004).

65 Para el cáncer de mama, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: el antígeno

de unión al receptor de cáncer que se expresa en las células SiSo (RCAS1) (Journal of Veterinary Medical Science, 6 (6): 651-658, 2004), X Sialilo de Lewis y T/Tn (Vet Pathol 46:222-226, (2009).

5 Para el cáncer testicular, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (Journal of Comparative Pathology, 113(4): 301-313, 1995), GATA-4 (factor de transcripción que se expresa en las células de Sertoli y menos comúnmente en las células de Leydig (intersticiales)) (Veterinary Pathology, doi:10.1354/vp.08-VP-0287-R-BC, 2009), inhibina-alfa y vimentina (J. Vet. Sci., 10(1), 1-7, 2009).

10 Para el cáncer de células mastocíticas, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: CD 117 (BMC Vet Res. 3:19, 2007), regiones nucleolares organizadoras del cromosoma teñidas con plata (AgNOR), y antígeno nuclear anti-células en proliferación (PCNA) (Veterinary Pathology, Vol 31, Número 6, 637-647, 1994).

15 Para el cáncer de vejiga, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: V-TBA, o antígeno tumoral de vejiga urinaria (Am J Vet Res. 64(8):1017-20, y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF).

20 Para el cáncer de próstata, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación a: antígeno de la fosfatasa ácida prostática, antígeno prostático específico (PSA), antígeno específico de la membrana prostática (PMSA), y la regulación negativa de la expresión de Na, K-ATPasa epitelial (Cancer Cell Int. 3:8, 2003).

25 Para el melanoma, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: el antígeno de melanoma canino reconocido por el anticuerpo monoclonal murino IBF9 (Am J Vet Res. 58(1): 46-52, 1997), S100, los antígenos específicos del melanoma humano (HMSA) 1 y 5, la enolasa específica de neuronas (NSE), vimentina e IBF-9 (<http://www.vetscite.org/publish/articles/000038/in-dex.html>).

30 Para la leucemia, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: la reorganización de los genes V β del TCR (por ejemplo, la detección de siete genes V β del TCR canino distintos) (Veterinary Immunology and Immunopathology, Volumen 69, Números de 2-4, Páginas de 113-119, 1999)

35 Para el carcinoma pulmonar, los antígenos y/o biomarcadores que se examinan incluyen pero sin limitación: las proteínas del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y Ki-67 (MIB1) (Journal of Comparative Pathology, 120(4): 321-332, 1999).

Ejemplo 6 Empobrecimiento de las Células Mieloides Supresoras para Aumentar las Respuestas de las Vacunas Tumorales en un Modelo Canino de Linfoma No-Hodgkin

40 Este ejemplo contiene referencias a publicaciones mediante el uso de números que corresponden a la lista de publicaciones al final del ejemplo. El objetivo general de este ejemplo es desarrollar vacunas terapéuticas de cáncer más eficaces utilizando el empobrecimiento de las CMS para aumentar las respuestas inmunitarias a las vacunas de cáncer existentes. La tasa de éxito de las vacunas tumorales actuales sigue siendo baja a pesar de que se ha dirigido una tremenda cantidad de esfuerzos al diseño de vacunas. La ineficacia relativa de las vacunas de cáncer actuales puede provenir en parte de las propiedades inmunosupresoras de las células mieloides supresoras (CMS),

45 que sirven para suprimir potentemente no solamente la actividad antitumoral, sino también para suprimir respuestas del sistema inmunitario a las vacunas en general. Los estudios preliminares indican que la eliminación de las CMS usando clodronato liposómico (CL) puede desencadenar la inmunidad antitumoral espontánea mediada por células T. Además, los estudios preliminares también indican que el empobrecimiento de las CMS puede aumentar las respuestas inmunitarias a las vacunas en animales sin tumores. Por lo tanto, este ejemplo detalla como el empobrecimiento de las CMS afecta a la generación de la inmunidad antitumoral después de la vacunación tumoral, usando tanto modelos tumorales en ratón como en perro. A continuación, usando un modelo canino espontáneo de Linfoma No-Hodgkin (NHL), se examina la cuestión de si enfoque del empobrecimiento de las CMS combinado con la vacunación tumoral es más eficaz en la reducción de la carga tumoral mínima residual que solamente la vacunación tumoral.

55 **Objetivo:** Para determinar el tiempo óptimo del empobrecimiento de las CMS para aumentar las respuestas inmunitarias a la vacunación tumoral usando modelos tumorales en ratón. La hipótesis de no unión que es el empobrecimiento de las CMS poco después de la vacunación potenciará significativamente las respuestas de células T a la vacunación y desencadenarán una actividad antitumoral significativamente potenciada.

Antecedentes y Justificación para las vacunas de Cáncer y NHL

65 El linfoma No Hodgkin (NHL) es un tumor importante de los seres humanos que se ha considerado una diana principal para la inmunoterapia con vacunas debido a que cada una de las células tumorales expresan un único antígeno tumoral (es decir, la molécula de inmunoglobulina de superficie idiopática). La mayor parte de las formas de NHL son relativamente refractarias al tratamiento con quimioterapia y los pacientes afectados tienen típicamente

- tiempos de supervivencia cortos. Por lo tanto, se han ideado una serie de enfoques de vacuna para el NHL (1-5). La mayor parte de las vacunas de NHL han utilizado el receptor de antígenos idiotípico como el antígeno diana para la inmunización. Se han llevado a cabo numerosos estudios de vacunas en pacientes de NHL y tres estudios en NHL han avanzado hasta el punto de completar los ensayos clínicos de fase III (5, 6). Desafortunadamente, a pesar de
- 5 que los resultados preliminares son alentadores, cada uno de los ensayos de fase III completados hasta el momento ha fallado en el alcance de los criterios de valoración originales (5). Las razones de los fallos en los ensayos de las vacunas no están claras, pero pueden estar relacionadas con el diseño de la vacuna, la insuficiente potencia de la vacuna o los criterios de inclusión de los pacientes.
- 10 A pesar de una falta de éxitos clínicos importantes, se ha hecho un progreso significativo en el diseño y la implementación de las vacunas del cáncer a lo largo de las dos décadas anteriores. Sin embargo, existen aún algunas vacunas de cánceres humanos que han avanzado más allá de los ensayos de fase I. Por lo tanto, es evidente que las mejoras graduales en el diseño de vacunas podrían no ser suficientes para superar los obstáculos considerables que enfrentan vacunas contra el cáncer. Por lo tanto, el foco de la investigación en la inmunoterapia
- 15 del cáncer ahora ha comenzado a cambiar hacia una mejor comprensión del papel del microambiente tumoral en la regulación de la inmunidad tumoral. Una nueva estrategia destinada que surge de esta reorientación es la idea de que la modificación o la elusión de los mecanismos inmunitarios de regulación e inhibición podrían usarse para mejorar la eficacia de las vacunas tumorales existentes.
- 20 **Las células mieloides supresoras (CMS) inhiben la inmunidad antitumoral.** Una serie de estudios recientes comenzó a definir de manera más completa el papel clave que desempeñan las células mieloides inmaduras en la inmunidad supresora de tumores (7-11). Esta población poco definida de células mieloides se menciona de forma colectiva como células mieloides supresoras (CMS). Recientemente, se ha mostrado que la población de CMS en animales con cáncer consiste en una mezcla de monocitos y neutrófilos inmaduros (12). A pesar de que difieren en
- 25 su linaje, se ha mostrado que tanto las CMS monocíticas como las neutrófilas suprimen la función de las células T y las células NK, aunque mediante distintos mecanismos. La supresión de las células T y las células NK está mediada por una serie de mecanismos, incluyendo la producción de especies de nitrógeno no reactivas, especies de oxígeno reactivas, y la expresión de TGF- β en superficie, y la producción de arginasa. En muchos casos, la inhibición mediante CMS requiere el contacto directo o muy estrecho con las células T. El resultado final es que las células T y las células NK de la vecindad de las CMS se vuelven funcionalmente incapaces de la citotoxicidad, proliferación y producción de citocinas. La generación de CMS a partir de la médula ósea está regulada por citocinas y factores de crecimiento producidos por las células en sí mismas, o producidos en respuesta a la inflamación asociada a tumores. Después de la liberación de la médula ósea, las CMS se distribuyen al bazo, médula ósea, drenaje de los ganglios linfáticos y tejidos tumorales.
- 30
- 35 Las células mieloides supresoras no solamente se generan en respuesta al cáncer, sino que también están provocadas por una variedad de estímulos inflamatorios. Por ejemplo, los números de CMS expandidos que están presentes en individuos con sepsis, infecciones crónicas (virales, fúngicas), y enfermedades inflamatorias crónicas (12). Por lo tanto, parece que las CMS probablemente han evolucionado para servir como moduladores negativos tanto de la inflamación aguda como de la crónica (7, 13). Vistas, por lo tanto, como reguladores negativos de la inflamación, sin ligarse a ninguna teoría, las CMS también pueden servir para obstaculizar las respuestas inmunitarias a las vacunas, especialmente las vacunas que provocan una inflamación significativa. Dicha respuesta sería particularmente pronunciada en individuos con cáncer, dado que estos ya poseen números muy expandidos de CMS (14). De hecho, se han notificado pruebas solamente para dicha respuesta de las CMS a la vacunación tumoral
- 40 en pacientes de melanoma vacunados con una vacuna de melanoma transducida con GM-CSF (15, 16). Si las CMS inhiben de hecho las respuestas de las vacunas tumorales, entonces eliminar a las CMS o bloquear sus efectos podría ayudar a reforzar las respuestas inmunitarias eficaces de las células T a la vacunación en pacientes con cáncer. Las pruebas experimentales en favor de esta idea proceden de los estudios de la diferenciación de las CMS inducida por el ácido trans-retinoico (ATRA), que conduce a que las células maduren en macrófagos o neutrófilos y revierte sus propiedades inmunosupresoras. Cuando los animales o los seres humanos que portan un tumor se trataron con ATRA, la inmunidad antitumoral espontánea mejoró y las respuestas de la vacuna se potenciaron significativamente (17-19). También se notificó una potenciación similar de las respuestas de las vacunas tumorales cuando se inhibió la producción de ROS por las CMS usando nitroaspirina (20).
- 45
- 50 Una cuestión es si el empobrecimiento en CMS puede restaurar la inmunidad tumoral y mejorar la eficacia de las vacunas tumorales. Basándose en la información anterior, sin ligarse a ninguna teoría, la eliminación de las CMS puede mejorar las respuestas de la vacuna tumoral. Actualmente, los dos únicas opciones realistas para eliminar a las CMS *in vivo* son el uso del empobrecimiento mediado por anticuerpos o el uso del clodronato liposómico. El empobrecimiento mediado por anticuerpos de las CMS ha mostrado alguna eficacia *in vitro* e *in vivo*, pero no se considera viable debido a que no se ha identificado un marcador de la superficie celular específico para las CMS
- 55 (21). Sin embargo, el empobrecimiento no específico de las células CD11b⁺/Gr-1⁺ con los anticuerpos da como resultado el empobrecimiento generalizado de macrófagos, monocitos y neutrófilos y aumenta el riesgo de inmunosupresión. El clodronato liposómico (CL) se ha usado exhaustivamente en el pasado para empobrecer los macrófagos y monocitos en ratones para una variedad de investigaciones inmunológicas (22-26). Cuando el fármaco de bisfosfonatos del clodronato se encapsula con liposomas neutros, los liposomas se captan eficazmente por las células mieloides fagocíticas (macrófagos, monocitos, CMS), seguido por la liberación intracelular de clodronato y la
- 60
- 65

inducción rápida de la apoptosis de los macrófagos a través de la competición por la unión a ATP (27, 28). Debido a que el CL no empobrece a los neutrófilos, el riesgo de inmunosupresión significativa se reduce considerablemente.

5 Más recientemente, el tratamiento con CL también ha demostrado actividad antitumoral en modelos tumorales en roedores, aunque en estos estudios los efectos antitumorales del tratamiento con CL se han atribuido a los efectos del empobrecimiento de los macrófagos asociados a tumores (MAT) y la inhibición de la angiogénesis tumoral (29-31). Se ha investigado uso de CL como un agente de empobrecimiento de macrófagos en modelos murinos y en perros con enfermedad autoinmunitaria (32, 33). Además del empobrecimiento de macrófagos, la administración sistémica (intravenosa) de CL también indujo un empobrecimiento significativo de las CMS, que se asoció con una actividad antitumoral significativa en ratones y en perros (34).

15 Sin embargo, la pregunta era si el tratamiento con CL podría mediar la actividad antitumoral a través de la inducción de efectos sistémicos en el sistema inmunitario, más que por los efectos locales del empobrecimiento de MAT en los tejidos tumorales. En efecto, la actividad antitumoral provocada por el tratamiento con CL se debía a la activación sistémica espontánea de la inmunidad antitumoral, más que al empobrecimiento de los MAT o la inhibición de la angiogénesis tumoral. Por lo tanto, sin ligarse a ninguna teoría, el empobrecimiento de las CMS usando CL podría, si se administrase en la secuencia apropiada con respecto a la vacunación, aumentar también significativamente la eficacia de las vacunas tumorales. De hecho, los experimentos que combinan el tratamiento con CL y la vacunación contra los antígenos modelo sugieren que justamente se produce un efecto tal. Por lo tanto, sin ligarse a ninguna teoría, el empobrecimiento de las CMS usando CL mejora la eficacia de las vacunas tumorales de NHL. Este ejemplo investiga esta hipótesis primero en modelos tumorales en ratón y para llevar a cabo después los experimentos de prueba iniciales en un modelo canino de NHL.

25 Resultados: Los estudios pasados de la actividad antitumoral provocada por la administración sistémica de CL se han centrado en parte en la determinación de cómo optimizar la administración de CL para generar una actividad antitumoral máxima, en la evaluación del espectro de los tipos tumorales que son susceptibles a la actividad antitumoral inducida por CL, y en la definición del/los mecanismo(s) por los cuales el CL genera actividad antitumoral. La administración intravenosa de CL provoca la inhibición significativa del crecimiento de tumores establecidos en modelos de ratón. Por ejemplo, la administración i.v. una vez a la semana de 200 μ l de CL a ratones C57B1/6 con tumores (sarcoma) MCA-205 s.c. establecidos produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral (Figura 1). De manera importante, la administración de un control de PBS que contiene liposomas (L-PBS) no provocó la actividad antitumoral. La actividad antitumoral similar también se generó en los ratones BALB/c con tumores CT-26 (carcinoma de colon). También se observó una actividad antitumoral significativa en los ratones con tumores B16 (melanoma) y 4T1 (carcinoma). Por lo tanto, la administración de CL inhibe el crecimiento tumoral en un tipo tumoral y una cepa de ratón de un modo independiente.

40 Los estudios en perros también han demostrado que el CL tiene actividad antitumoral. Por ejemplo, dos veces a la semana la administración i.v. de CL a perros con sarcoma de tejidos blandos (STB) o histiocitosis maligna (HM) provoca la regresión tumoral en aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados. Tal como se muestra en la Figura 2, un perro con un STB tratado con una serie de tratamientos con CL solo, experimentó una regresión significativa del tumor espontáneo que comenzaba después de la tercera administración de CL. También se han observado respuestas al tratamiento en perros con HM tratada con CL (34). De manera importante, el tratamiento con CL se toleró bien por los perros, incluso aquellos con cáncer avanzado, y el único efecto secundario notable fue la fiebre transitoria, que de manera interesante solamente se observó en los perros con HM. Por lo tanto, el CL es también un agente antitumoral eficaz y bien tolerado en perros con cáncer.

50 Se han hecho estudios para dilucidar los mecanismos inmunológicos mediante los cuales el tratamiento con CL puede inducir la actividad antitumoral espontánea. Dado que el CL es conocido desde antes de los estudios para empobrecer a las células fagocíticas, se investigó si el tratamiento con CL podría empobrecer a las células mieloides supresoras (CMS), particularmente las CMS monocíticas (35). Veinticuatro horas antes de la administración i.v. de CL en ratones que portaban un tumor, se enumeraron CMS CD11b⁺/Gr-1⁺ en bazo, sangre y muestras tumorales (Figura 3). El empobrecimiento significativo de las CMS ocurrió en la sangre (Figura 3), bazo y tejidos tumorales, y que la mayor parte de las células empobrecidas eran monocíticas. Además, hubo un empobrecimiento de MAT e inhibición significativa de la angiogénesis tumoral en los ratones tratados con CL. Por lo tanto, la administración sistémica de CL provocó un empobrecimiento significativo de múltiples poblaciones distintas de células mieloides fagocíticas, incluyendo CMS, en animales con cáncer.

60 Basándose en el hecho de que la administración i.v. de CL dio como resultado el empobrecimiento sistémico de las CMS, la siguiente etapa fue investigar si los efectos antitumorales del tratamiento con CL estaban mediados por efectos locales (es decir, empobrecimiento de MAT) o por efectos inmunológicos sistémicos. Para abordar esta cuestión, los ratones portadores de tumores que carecían de células T (ratones RAG2^{-/-}) se trataron con CL y se compararon las tasas de crecimiento tumoral de los MCA con las de ratones C57B1/6 de tipo silvestre tratados con CL. El efecto antitumoral del tratamiento con CL se suprimió casi completamente en los ratones RAG2^{-/-}, lo que sugirió que la actividad antitumoral de CL estaba mediada por células T. Por lo tanto, para determinar que subconjunto de células T mediaba la actividad antitumoral de la actividad de CL, se repitió el experimento con tumores en los ratones CD8^{-/-} y CD4^{-/-}. La actividad antitumoral de CL se eliminó casi completamente en los ratones

CD8^{-/-} (Figura 4), mientras que la actividad de CL se inhibió solamente de modo parcial en los ratones CD4^{-/-}. Los controles también incluyeron ratones tratados con PBS que contenía liposomas (control lip). Por lo tanto, la actividad antitumoral provocada por la administración i.v. de CL estaba mediada por la activación sistémica de la inmunidad antitumoral de células T CD8, más que por los efectos locales sobre los MAT o la angiogénesis tumoral. Estos resultados son importantes porque sugieren que el empobrecimiento de las CMS y la activación de la inmunidad sistémica es probablemente el mecanismo principal por el cual el CL genera actividad antitumoral.

Los experimentos anteriores, en los cuales el empobrecimiento de las CMS mediado por CL fue capaz de generar la actividad antitumoral mediada por células T CD8 espontánea, también sugirieron que el empobrecimiento de las CMS podría ser capaz de potenciar las respuestas de las vacunas. Para abordar esta cuestión, se vacunaron los ratones s.c. usando una vacuna con adyuvante CLDC (36) que contenía ovoalbúmina como un antígeno modelo y la pregunta fue si el empobrecimiento de las CMS usando CL podría potenciar las respuestas de la vacuna, usando respuestas inmunitarias humorales como lectura (Figura 5). Los ratones se vacunaron una vez solamente con la vacuna ova/CLDC, o con ova/CLDC más un tratamiento con CL 3 días antes de la inmunización (CL antes de Vac), u ova/CLDC más un tratamiento con CL 3 días después de la inmunización (CL después de Vac). Se recogió la sangre y se determinaron las respuestas de IgG para ova mediante ELISA. Los ratones vacunados con ova/CLDC y tratados con CL tres días después de la inmunización desarrollaron respuestas de anticuerpos significativamente más altas que los ratones vacunados solamente con ova/CLDC o con ova/CLDC más CL 3 días antes de la inmunización. Por lo tanto, estos datos sugieren que de hecho el empobrecimiento de las CMS puede potenciar las respuestas inmunitarias a la vacunación cuando se administra en la secuencia adecuada con respecto a la vacuna. Además, debería tenerse en cuenta que este experimento se llevó a cabo en ratones que no portaban tumores, mientras que podría esperarse que el efecto potenciador de la vacuna fuera más pronunciado en animales que portan un tumor con poblaciones mucho mayores de CMS.

25 Diseño Experimental

Objetivo: Determinar cómo los tiempos de empobrecimiento de las CMS afectan a las respuestas de células T inducidas por vacunas.

Aunque el CL es eficaz en el empobrecimiento de las CMS, la administración de CL también da como resultado el empobrecimiento de otras células mieloides relevantes, incluyendo los macrófagos y las CD. Por lo tanto, es posible que la administración de CL pudiera inhibir o aumentar las respuestas de las vacunas, dependiendo de que células se empobrecieran y cuando se empobrecieron con respecto a la vacunación. Por lo tanto, los modelos de inmunización en ratón se usan para determinar el efecto de los tiempos de la administración sistémica de CL sobre las respuestas inmunitarias humorales para la vacunación con vacunas con adyuvante CLDC. Los experimentos iniciales usan un modelo antigénico, dado que las lecturas para estos experimentos son muy robustas y reproducibles. Una vez que se identifiquen los tiempos de administración, se confirma la relevancia de estos hallazgos en dos modelos de cáncer en ratón. El modelo de melanoma B16 se seleccionó debido a que las respuestas de células T CD8 pueden rastrearse usando tetrámeros, mientras que el modelo de linfoma A20 se seleccionó debido a la estrecha similitud con el modelo de NHL en perros. Además, se usan líneas celulares A20 que se han transfectado con el antígeno HA, las cuales permiten una evaluación más precisa de las respuestas de células T CD4.

Enfoque Experimental:

Objetivo: para determinar los tiempos óptimos de empobrecimiento de las CMS para aumentar las respuestas de células T y de anticuerpos con un antígeno nominal o con un antígeno tumoral. Estos experimentos están diseñados para 1) determinar si el empobrecimiento de las CMS combinado con la vacunación potencia las respuestas inmunitarias en ratones normales y en los que portan un tumor; 2) identificar los tiempos óptimos de empobrecimiento de las CMS con respecto a la vacunación para maximizar las respuestas inmunitarias; y 3) evaluar los efectos del empobrecimiento de las CMS combinado con la inmunización en la inmunidad antitumoral en dos modelos tumorales en ratón.

Grupo	Vacunación	empobrecimiento de CMS
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	día -7
5	+	día -3

6	+	día -1
7	+	concurrente
8	+	día +1
9	+	día +3

Determinación de los tiempos óptimos del empobrecimiento de las CMS con respecto a la vacuna para provocar respuestas de células T máximas. Estos experimentos están diseñados para determinar el tiempo óptimo de empobrecimiento de CMS usando un tratamiento con CL para generar respuestas máximas de células T. En los primeros experimentos, se vacunó a los ratones C57B1/6 normales (n = 5 por cada grupo) con Ova, usando un potente adyuvante de liposoma-ácido nucleico (CLDC) desarrollado como el que se menciona en la publicación (36). Los 10 grupos experimentales de animales a evaluar se describen en la Tabla 1. Los ratones se vacunan s.c. con 5 ug de Ova en adyuvante CLDC. El empobrecimiento de las CMS se lleva a cabo usando una sola inyección de 200 ul de clodronato liposómico (CL) administrado i.v. Se somete a eutanasia a los ratones 7 días después de la vacunación y se recogen los tejidos linfoides y el suero. Las lecturas incluyen la evaluación de las respuestas CD8 mediante citometría de flujo (tetrámeros K^b-ova), de las respuestas CD4 (liberación de citocinas y ensayos de proliferación), y respuestas humorales (los anticuerpos en suero para Ova se cuantifican mediante ELISA).

Análisis estadístico de los datos. Las respuestas inmunitarias en los ratones tratados se comparan con los ratones control, no tratados, usando un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), seguido de un ensayo comparación de múltiples medios de Dunn. También se hacen análisis similares para los siguientes datos. El análisis estadístico se hace usando un programa informático comercial (Prism5, GaphPad, San Diego, CA) y se define la significación como p < 0,05.

El tratamiento con CL bien 1 día o 3 días después de la inmunización genera respuestas inmunitarias óptimas, que se reflejan por números aumentados de células T CD8 específicas de Ova, mayor producción de IFN- γ , y títulos de anticuerpos más altos. Estos ensayos se hacen rutinariamente en el laboratorio. Los resultados permiten la identificación clara del tiempo óptimo de empobrecimiento de las CMS para potenciar las respuestas de las vacunas. Si las lecturas no están claras después de una sola inmunización, entonces se repite el experimento usando una inmunización de refuerzo administrada 2 semanas después de la primera inmunización para aumentar los números de células T específicas de antígeno.

Evaluación de los efectos del empobrecimiento de las CMS en las respuestas inmunitarias y la actividad antitumoral después de la vacunación contra antígenos tumorales. Estos experimentos están diseñados para determinar si el empobrecimiento de las CMS puede aumentar las respuestas de células T contra los antígenos tumorales en ratones con tumores establecidos, usando dos modelos tumorales distintos. En el primer modelo, se usan ratones C57B1/6 con melanomas B16, debido a que se ha identificado un antígeno tumoral bien definido (trp2) se ha identificado en este modelo que permite la cuantificación precisa de las respuestas de células T CD8 usando reactivos de tetrámero. Usando el programa de empobrecimiento de las CMS óptimo determinado anteriormente, se vacunó a los ratones (n = 5 por cada grupo) con tumores B16 cutáneos establecidos s.c. con 5 ug de péptido trp2 en adyuvante CLDC, después se reforzaron 7 días más tarde. Los grupos de tratamiento incluyen ratones control, no vacunados, ratones solamente vacunados, ratones solamente tratados con CL y ratones tratados con vacunación más tratamiento con CL. Los números de células T CD8 específicas de trp2 en sangre, bazo y GL se evaluó 5 días después del refuerzo, usando citometría de flujo y tetrámeros Kb-trp2. Estos ejemplos se repitieron en otro grupo de ratones para evaluar los efectos del empobrecimiento de las CMS/vacunación en las respuestas de crecimiento tumoral. En estos estudios, las tasas de crecimiento tumoral se evalúan por medio de una medición 3 veces/semana del diámetro del tumor. Además, se evalúan los tiempos de supervivencia total de los ratones tratados y los controles.

En un segundo modelo tumoral, se evalúan las respuestas inmunitarias a la vacunación en los ratones BALB/c con linfomas A20-HA. En este modelo, el tumor se ha manipulado para que exprese el antígeno HA de la gripe para facilitar la medición de las respuestas de células T. Se evalúan dos vacunas distintas: 1) células A20-HA fijadas en paraformaldehído (1 X 10⁶ células A20 inactivadas por vacuna, administradas con adyuvante CLDC) o 2) vacuna de antígeno HA, 5 ug rHA en adyuvante CLDC. Se vacunó a los ratones (n = 5 por cada grupo) con tumores A20 cutáneos establecidos s.c. bien con células tumorales A20-HA autólogas en adyuvante CLDC, o con rHA en adyuvante CLDC, después se reforzaron 7 días más tarde. Los grupos de tratamiento incluyen ratones control, no vacunados, ratones solamente vacunados, ratones solamente tratados con CL y ratones tratados con vacunación más tratamiento con CL. Las respuestas inmunitarias a evaluar incluyen la medición de las respuestas de citocinas para la vacunación (liberación de citocinas *in vitro* después de la reestimulación del bazo o las células de GL con células tumorales fijadas o con antígeno HA), las respuestas proliferativas (proliferación de las células del bazo o de las células de GL después de la reestimulación *in vitro* durante 96 horas con células tumorales A20 fijadas o con antígeno rHA) y la evaluación de la actividad de los LCT *in vivo* (destrucción *in vivo* de las células tumorales A20

marcadas con CSFE transferidas adoptivamente; anteriormente descritas (36). Los experimentos se repitieron en otro grupo de ratones para evaluar los efectos del empobrecimiento de las CMS/vacunación en las respuestas tumorales. En estos estudios, las tasas de crecimiento de los tumores A20 implantados por vía subcutánea se evalúan por medio de una medición 3 veces a la semana del diámetro del tumor. Además, se determinan los tiempos de supervivencia total de los ratones tratados y los controles.

El protocolo combinado de empobrecimiento de las CMS/vacunación induce un aumento significativo del número de células T CD8 específicas de trp2 en el modelo tumoral B16, en comparación con la vacunación sola o con el empobrecimiento de las CMS solo. Si no se observa efecto aditivo de los dos tratamientos, se repite el tratamiento usando una administración de CL dos veces a la semana, en caso de que los números CMS en los ratones que portan tumores sean aún suficientes para inhibir las respuestas de la vacuna. Si la magnitud de las respuestas de células T CD8 específicas de trp2 demasiado baja para medirla directamente *ex vivo*, entonces las células se cultivan durante 4-5 días *in vitro* en presencia de IL-2 y un péptido específico para expandir los números de células T antes de hacer el ensayo de tetrámeros. El aumento en los números de las células T específicas de trp2 se correlaciona con una relación significativa en la tasa de crecimiento tumoral y unos tiempos de supervivencia total aumentados en los ratones que reciben terapia combinada de empobrecimiento de las CMS/vacunación. El papel de las células T CD8 en la respuesta inmunitaria antitumoral se confirma usando ratones CD8^{-/-}, o mediante el empobrecimiento de células T CD8 mediado por anticuerpos después de la inmunización.

En el modelo A20-HA, la liberación de citocinas de las células T y la actividad de los LTC aumenta en los ratones que reciben la terapia combinada de empobrecimiento de las CMS/terapia de vacunación. Utilizando tanto las células del tumor completas como la vacunación con HA y los ensayos inmunitarios, se generan datos interpretables. Las tasas de crecimiento tumoral se ralentizaron significativamente y la supervivencia mejoró en los ratones vacunados con células tumorales autólogas más empobrecimiento de las CMS. La vacunación con la vacuna tumoral autóloga es más probablemente eficaz que la vacunación con el antígeno HA solamente debido a la mayor complejidad y número de antígenos potenciales en células tumorales fijadas.

Objetivo: Determinar si la vacunación tumoral combinada con el empobrecimiento de las CMS reduce significativamente la carga tumoral residual en un modelo canino de linfoma No Hodgkin.

Justificación. Los experimentos en modelos tumorales en ratón son útiles para optimizar los tiempos de la vacuna y la administración de CL para maximizar la inmunidad celular, y también para evaluar la actividad antitumoral. Sin embargo, las limitaciones de los modelos tumorales en ratón en la predicción de los resultados en los estudios del cáncer en seres humanos son bien conocidas. Por lo tanto, se usan los modelos tumorales de NHL espontáneo con mejor disponibilidad, los perros con linfoma de células B. Este modelo se ha usado en el pasado para evaluar la eficacia de una vacuna autóloga de linfoma preparada usando células tumorales transfectadas con CM-CSF. El enfoque de vacunar a los perros con células tumorales autólogas completas fijadas puede no ser completamente análogo a las vacunas de NHL para seres humanos, que habitualmente consisten en moléculas idiotípicas de Ig recombinantes, sin embargo, construir dicha vacuna es muy difícil en el modelo tumoral en perro. La inmunización con células tumorales fijadas con paraformaldehído, que conserva la superficie de las moléculas de Ig, genera respuestas de vacunación relevantes. Usando un diseño de estudio conservativo con 3 grupos de tratamiento de perros, se determina si el tratamiento con CL puede aumentar significativamente las respuestas de la vacuna tumoral de NHL. Además, el uso de cambios en la carga mínima residual de enfermedad (CMR) después de la vacunación como criterio principal para el estudio (en lugar del ILE o el OST, del inglés one site test) permite estudiar los criterios a alcanzar mucho más rápido y con mayor precisión potencial. Este tipo de datos también es muy relevante para la evaluación de la terapia de empobrecimiento de las CMS con CL como una estrategia para su uso con vacunas de NHL para seres humanos.

Diseño del ensayo. Estos estudios se han diseñado como un estudio de las pruebas principales en perros con linfoma de células B, el equivalente canino al NHL en seres humanos. La meta principal de este estudio es determinar si la vacunación más el empobrecimiento de las CMS genera una mayor reducción de la carga tumoral residual (ADN tumoral circulante detectable por qRT-PCR en el torrente sanguíneo (37) que la vacunación sola o el empobrecimiento de las CMS solo. Basándose en parte en los estudios en ratones, el tamaño de 8 perros en cada grupo deber permitir la determinación de una diferencia significativa en el tratamiento, basándose en una reducción del 30 % en las CMR en perros vacunados/con empobrecimiento de las CMS en comparación con perros a los que solamente se les vacuna o solamente se les trata con CL, con un poder del 80 % (programa informático de cálculo de la potencia PS y el tamaño muestral). Por lo tanto, se reclutaron 24 perros con linfoma de células B histológicamente confirmado en un ensayo clínico aleatorio. Se trató a cada perro con quimioterapia convencional (doxorubicina más Lasparaginasa) durante 10 semanas para alcanzar una remisión tumoral completa macroscópicamente visible, a cuyo tiempo se distribuyó aleatoriamente a los perros en el grupo de tratamiento 1 (solamente vacuna); grupo de tratamiento 2 (solamente tratamiento con CL); o grupo de tratamiento 3 (vacuna más tratamiento con CL). En el grupo 1 y 3 se vacuna a los perros una vez cada 2 semanas durante 5 inmunizaciones totales, usando células de linfoma autólogas (1×10^7 células fijadas en paraformaldehído por cada vacunación, se administran s.c. en 2 ml de adyuvante CLDC). Los perros del grupo 2 reciben una serie de 5 infusiones de CL (0,5 ml/kg) una vez cada dos semanas. Los perros del grupo 3 están vacunados y tratados con CL, usando los tiempos óptimos para la administración de CL con respecto a la vacunación determinado en uno de los objetivos

anteriores.

La sangre se recoge antes del tratamiento, y en las semanas 2, 4, 6, 8, y 10 de tratamiento para la determinación de CMR y para los ensayos inmunológicos. El tamaño de los ganglios linfáticos se determina en cada visita de reevaluación. Se realiza un CBC en cada reevaluación para evaluar los números de monocitos y neutrófilos. Al final del estudio, se continúa siguiendo a los perros en un seguimiento por teléfono para determinar el tiempo de recurrencia del primer tumor (intervalo libre de enfermedad; ILE).

Preparación de la vacuna tumoral y el CL para el empobrecimiento en CMS Las vacunas tumorales autólogas se preparan usando células de linfoma recogidas de biopsias de ganglios linfáticos obtenidas de cada paciente antes de la administración de la quimioterapia. Las suspensiones de una sola célula de células tumorales se preparan usando una disociación enzimática suave. Las células tumorales se fijan después durante toda la noche en una solución de paraformaldehído al 1 % en PBS, que está diseñada para fijar ligeramente y destruir las células tumorales, mientras aún conservan los antígenos de superficie. Las alícuotas de células tumorales fijadas se almacenan en congelación hasta que se usan para producir la vacuna. La vacuna se prepara usando 1×10^7 células tumorales mezcladas con 2 ml de adyuvante CLDC, usando una técnica similar a la que se notificó anteriormente para preparar una vacuna tumoral alogeneica para perros con hemangiosarcoma (38). La vacuna se administra por vía intradérmica en 2 sitios distintos a lo largo del tórax lateral. Las vacunaciones se repiten durante un total de 5 inmunizaciones en intervalos de 2 semanas. El empobrecimiento de las CMS se lleva a cabo mediante administración i.v. de CL, que se prepara tal como se describe para el tratamiento de los perros con histiocitosis maligna (34). El CL se administra una vez cada 2 semanas mediante infusión i.v. lenta a lo largo de 60 minutos, a una dosis de 0,5 ml/kg. Esta dosis de CL se ha tolerado bien por perros anteriormente, siendo la fiebre transitoria el efecto adverso más frecuente en aproximadamente el 30 % de los perros tratados con HM.

Evaluación de las respuestas de las vacunas. Las respuestas de las vacunas se evalúan usando PBMC recogidos antes del tratamiento y en las semanas 2, 4, 6, 8, y 10 del tratamiento. Los PBMC se descongelan y después se incuban con células de linfoma autólogas fijadas con PFA a 3 proporciones distintas (1:1, 1:10, 1:100) durante 96 horas, y se evalúa la proliferación usando la incorporación de BrDU y citometría de flujo. Además, los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se ensayaron con respecto a la determinación de las concentraciones de IFN- γ , usando un ELISA de IFN- γ canino comercial (R & D Systems). Se incorpora un neoantígeno (KLH) a la vacuna con el fin de facilitar la evaluación de las respuestas de las vacunas, tal como se notificó anteriormente (39). Las respuestas inmunitarias para KLH se evalúan mediante la proliferación y la liberación de IFN- γ , usando PBMC incubados con 50 μ g/ml de KLH *in vitro* durante 96 horas. Además, las respuestas de anticuerpos para KLH se evalúan usando un ELISA de KLH (39).

Evaluación de una remisión molecular después de la quimioterapia y la vacunación. Las muestras tumorales se recogen al comienzo del estudio para diseñar un conjunto de cebadores específicos del BCR tumoral para la amplificación del BCR tumoral (40, 41). Las muestras de sangre para la determinación por PCR del número de células de linfoma circulantes (CMR) se recogen al finalizar la quimioterapia (inmediatamente antes de la primera vacuna) y en intervalos de 2 semanas durante la fase de tratamiento del estudio. Los PBMC se separan y se congelan en 3 alícuotas distintas, para usarlos en el cálculo de la CMR y en la evaluación de la función inmunitaria. Las células circulantes del tumor se cuantifican usando una PCR cuantitativa de tiempo real PCR (qRT-PCR) y un protocolo anteriormente descrito para la cuantificación de la carga de CMR en perros con linfoma de células B (37). En ese estudio, que utilizó los cebadores de PCR diseñados específicamente para un idiotipo de Ig de un paciente individual, se notificó que la técnica de PCR era lo suficientemente sensible para detectar las células tumorales circulantes en cada uno de los 7 perros, incluso después de la remisión tumoral visible completa que se indujo usando quimioterapia convencional. Además, en los 7 perros estudiados, la carga tumoral circulante aumentó después del cese de la quimioterapia y el ensayo fue predictivo para el tiempo de recurrencia tumoral macroscópica. Por lo tanto, el enfoque de qRT-PCR alcanza una cuantificación precisa de la respuesta tumoral con respecto a la vacunación y el empobrecimiento de las CMS (es decir, remisión molecular). Además, las comparaciones entre grupos podrían ser lo suficientemente robustas para abordar la cuestión principal del estudio (es decir, la vacunación/empobrecimiento de las CMS combinado es más eficaz que cualquiera de los dos solamente) sin tener que incluir un grupo adicional de perros con linfoma tratados únicamente con quimioterapia.

Sin ligarse a ninguna teoría, el tratamiento combinado con la vacuna tumoral autóloga y el CL rinde una reducción mayor, incluso una reducción significativamente mayor, de las CMR tumorales, en comparación con los perros que reciben solamente la vacuna tumoral o solamente el tratamiento con CL. La vacunación sola o el tratamiento con CL solo también reducen significativamente las CMR en comparación con los valores pre-tratamiento, pero el tratamiento combinado de vacuna/tratamiento con CL genera una actividad antitumoral sinérgica. Mientras que la reducción de las CMR es el criterio principal del estudio, los ensayos inmunitarios (proliferación, producción de citocinas, destrucción de células diana) se correlacionan con los ensayos CMR.

Citas bibliográficas

1. Veelken, H., y F. Osterroth. 2002. Vaccination strategies in the treatment of lymphomas. *Oncology* 62:187-200.
2. Leitch, H. A., y J. M. Connors. 2005. Vaccine therapy for non-Hodgkin's lymphoma and other B-cell

- malignancies. *Curr Opin Investing Drugs* 6:597-604.
3. Park, H. J., y S. S. Neelapu. 2008. Developing idiotype vaccines for lymphoma: from preclinical studies to phase III clinical trials. *British journal of haematology* 142:179-191.
4. Briones, J. 2008. Therapeutic vaccines for non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Clin Transl Oncol* 10:543-551.
5. Houot, R., y R. Levy. 2009. Vaccines for lymphomas: idiotype vaccines and beyond. *Blood reviews* 23:137-142.
6. Bendandi, M. 2004. The role of idiotype vaccines in the treatment of human B-cell malignancies. *Expert review of vaccines* 3:163-170.
7. Gabrilovich, D. I., y S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174.
10. Pollard, J. W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71-78.
9. Ostrand-Rosenberg, S., y P. Sinha. 2009. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182:4499-4506.
15. Ostrand-Rosenberg, S., P. Sinha, E. A. Danna, S. Miller, C. Davis, y S. K. Dissanayake. 2004. Antagonists of tumor-specific immunity: tumor-induced immune suppression and host genes that coopt the anti-tumor immune response. *Breast Dis* 20:127-135.
11. Kusmartsev, S., y D. I. Gabrilovich. 2006. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55:237-245.
12. Heithoff, D. M., E. Y. Enioutina, D. Bareyan, R. A. Daynes, y M. J. Mahan. 2008. Conditions that diminish myeloid-derived suppressor cell activities stimulate cross-protective immunity. *Infect Immun* 76:5191-5199.
20. Nagaraj, S., M. Collazo, C. A. Corzo, J. I. Youn, M. Ortiz, D. Quiceno, y D. I. Gabrilovich. 2009. Regulatory Myeloid Suppressor Cells in Health and Disease. *Cancer Res*.
14. Almand, B., J. I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone, y D. I. Gabrilovich. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166:678-689.
25. Filipazzi, P., R. Valenti, V. Huber, L. Pilla, P. Canese, M. Iero, C. Castelli, L. Mariani, G. Parmiani, y L. Rivoltini. 2007. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* 25:2546-2553.
30. Serafini, P., R. Carbley, K. A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, y I. Borrello. 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* 64:6337-6343.
17. Kusmartsev, S., F. Cheng, B. Yu, Y. Nefedova, E. Sotomayor, R. Lush, y D. Gabrilovich. 2003. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res* 63:4441-4449.
35. Mirza, N., M. Fishman, I. Fricke, M. Dunn, A. M. Neuger, T. J. Frost, R. M. Lush, S. Antonia, y D. I. Gabrilovich. 2006. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* 66:9299-9307.
19. Morse, M. A., J. R. Hall, y J. M. Plate. 2009. Countering tumor-induced immunosuppression during immunotherapy for pancreatic cancer. *Expert Opin Biol Ther* 9:331-339.
40. De Santo, C., P. Serafini, I. Marigo, L. Dolcetti, M. Bolla, P. Del Soldato, C. Melani, C. Guiducci, M. P. Colombo, M. Iezzi, P. Musiani, P. Zanovello, y V. Bronte. 2005. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci EEUU* 102:4185-4190.
45. Sinha, P., V. K. Clements, y S. Ostrand-Rosenberg. 2005. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* 174:636-645.
22. Claassen, E., N. Kors, y N. van Rooijen. 1987. Immunomodulation with liposomes: the immune response elicited by liposomes with entrapped dichloromethylene-diphosphonate and surface-associated antigen or hapten. *Immunology* 60:509-515.
50. Claassen, I., N. Van Rooijen, y E. Claassen. 1990. A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations *in vitro*, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 134:153-161.
24. Randolph, G. J., C. Jakubzick, y C. Qu. 2007. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol*.
55. Tacke, F., F. Ginhoux, C. Jakubzick, N. van Rooijen, M. Merad, y G. J. Randolph. 2006. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Immunol Methods* 203:583-597.
26. Van Rooijen, N., N. Kors, M. vd Ende, y C. D. Dijkstra. 1990. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 260:215-222.
60. van Rooijen, N. 1992. Liposome-mediated elimination of macrophages. *Res Immunol* 143:215-219.
28. Van Rooijen, N., y A. Sanders. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174:83-93.
29. Zeisberger, S. M., B. Odermatt, C. Marty, A. H. Zehnder-Fjallman, K. Ballmer-Hofer, y R. A. Schwendener. 2006. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 95:272-281.
- 65

30. Condeelis, J., y J. W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266.
31. Gazzaniga, S., A. I. Bravo, A. Guglielmotti, N. van Rooijen, F. Maschi, A. Vecchi, A. Mantovani, J. Mordoh, y R. Wainstok. 2007. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 127:2031-2041.
- 5 32. Bosio, C. M., y S. W. Dow. 2005. Francisella tularensis induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells. *J Immunol* 175:6792-6801.
33. Mathes, M., M. Jordan, y S. Dow. 2006. Evaluation of liposomal clodronate in experimental spontaneous autoimmune hemolytic anemia in dogs. *Exp Hematol* 34:1393-1402.
- 10 34. Hafeman, S., C. London, R. Elmslie, y S. Dow. 2009. Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs. *Cancer Immunol Immunother*.
35. Youn, J. I., S. Nagaraj, M. Collazo, y D. I. Gabrilovich. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181:5791-5802.
36. Zaks, K., M. Jordan, A. Guth, K. Sellins, R. Kedl, A. Izzo, C. Bosio, y S. Dow. 2006. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* 176:7335-7345.
37. Yamazaki, J., K. Baba, Y. Goto-Koshino, A. Setoguchi-Mukai, Y. Fujino, K. Ohno, y H. Tsujimoto. 2008. Quantitative assessment of minimal residual disease (CMR) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Veterinary immunology and immunopathology* 126:321-331.
- 20 38. U'Ren, L. W., B. J. Biller, R. E. Elmslie, D. H. Thamm, y S. W. Dow. 2007. Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 21:113-120.
39. Walter, C. U., B. J. Biller, S. E. Lana, A. M. Bachand, y S. W. Dow. 2006. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 20:342-347.
- 25 40. Burnett, R. C., W. Vernau, J. F. Modiano, C. S. Olver, P. F. Moore, y A. C. Avery. 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary pathology* 40:32-41.
41. Lana, S. E., T. L. Jackson, R. C. Burnett, P. S. Morley, y A. C. Avery. 2006. Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 20:329-334.
- 30 42. Avery, A. 2009. Molecular diagnostics of hematologic malignancies. *Topics in companion animal medicine* 24:144-150.

35 Ejemplo 7 Ensayo Clínico del activador de Monocitos/Macrófagos L-MTP-PE

Los monocitos y macrófagos activados eliminan las células resistentes a quimioterapia *in vitro*, y por lo tanto los agentes que activan estas células efectoras de la inmunidad innata pueden complementar la quimioterapia. El motivo mínimo de péptidoglucano muramil dipéptido (MDP), compuesto por ácido N-acetilmurámico unido a un dipéptido de L-alanina, D-isoglutamina, es un componente común de la membrana de las bacterias Gram-negativas y las bacterias Gram-positivas. Un importante componente del adyuvante completo de Freund, el MDP activa a los

40 monocitos y a los macrófagos a través del receptor inmunitario innato NALP3. El muramil tripéptido de fosfatidietanolamina (MTP-PE) es una conjugación sintética de alanina y dipalmitoilfosfatiletanolamina con MDP, creando una molécula lipófila con mayor potencia, mejorando la captación celular y reforzando la actividad tumoricida. El MTP-PE lipofílico también se incorpora más fácilmente en liposomas para la captación rápida

45 mediante células fagocíticas. Los estudios farmacocinéticos en perros confirmaron el aclaramiento rápido y una reducción de 10 veces de la toxicidad. Basándose en estudios preclínicos prometedores, los ensayos clínicos se llevaron a cabo en varios cánceres caninos y felinos. Después de la resección quirúrgica, se administró L-MTP-PE a una dosis de 2 mg/m² dos veces a la semana durante 8 semanas sola o en combinación con quimioterapia (doxorubicina y ciclofosfamida, o cisplatino). Cuando se administró inmediatamente después de la cirugía, el

50 tratamiento con L-MTP-PE confirió un tiempo medio de supervivencia de 222 días, significativamente más largo ($p < 0,002$) que en los perros tratados con liposomas con placebo (77 días). Los perros no metastáticos tratados con L-MTP-PE después del cisplatino tuvieron un tiempo medio de supervivencia de 14,4 meses, de nuevo significativamente más largo ($p < 0,01$) que en los perros tratados con cisplatino y placebo (9,8 meses); el tratamiento con L-MT-PE concurrente con cisplatino también mejoró el tiempo medio de supervivencia, pero la diferencia de 1,6

55 meses no fue significativa. También se observó una supervivencia libre de la enfermedad más larga del melanoma en estadio temprano, pero no tuvo efecto en los tumores mamarios felinos o caninos después de la mastectomía.

Basándose en el éxito de estos estudios en animales de compañía, se llevaron a cabo una serie de estudios exploratorios en fase I en aproximadamente 150 pacientes con diversos cánceres avanzados (mama, colorrectal, pulmonar, melanoma, carcinoma de células renales, cánceres de estómago y glándulas salivares así como sarcoma). Estos estudios determinaron la dosis máxima tolerada de L-MTP-PE y la dosis biológica óptima, indicando una dosificación similar a la de los estudios en caninos. De 1993-1997, un estudio clínico en fase III evaluó la eficacia del L-MTP-PE (mifamurtida) y/o ifosfamida añadida al régimen convencional de doxorubicina, cisplatino y una dosis alta de metotrexato en pacientes recientemente diagnosticados con osteosarcoma de alto grado. El

60 ensayo incluyó 678 pacientes con osteosarcoma no metastático resecable, 332 recibiendo L-MTP-PE, y 115, y 115 pacientes con osteosarcoma metastático u osteosarcoma no resecable, con 39 recibiendo L-MTP-PE. La adición de

ifosfamida y los tres fármacos quimioterapéuticos no aumentaron significativamente la supervivencia libre de fármaco (SLF) o la supervivencia total (ST) con respecto a las normas de cuidado, pero la adición de L-MTP-PE mejoró significativamente ambos (SLF $p = 0,030$; LS $p=0,039$). IDM Pharma Inc presentó una NDA para L-MTP-PE en 2006, pero recibió una carta de no autorizable en 2007 solicitando datos adicionales. En marzo de 2009, L-MT-PE (mifamurtida, MEPACT[®]) obtuvo una autorización para la comercialización centralizada por la Comisión Europea, permitiendo comercializar el fármaco en la Unión Europea.

La ruta de desarrollo del L-MTP-PE ejemplifica el modo en que cual los estudios en osteosarcoma en seres humanos y en caninos pueden avanzar en paralelo, proporcionando un flujo de dos vías de información que puede conducir a la optimización de fármacos para el tratamiento del osteosarcoma en ambas especies.

Ejemplo 8 Optimización de la Electroquimioterapia (ECT)

Algunos fármacos, incluyendo los agentes quimioterapéuticos para el cáncer bleomicina y cisplatino, son altamente lipofóbos y por lo tanto tienen poca captación celular. La bleomicina es tan lipofoba que no puede entrar en las células diana a través de difusión simple, requiriendo una captación relativamente lenta e ineficaz a través de receptores de proteínas específicos dando como resultado $< 0,1$ % de internalización en células cultivadas. Las altas dosis sistémicas requeridas debido a la poca captación han causado una toxicidad considerable para el tejido normal, impidiendo la adopción de la bleomicina como un agente anticancerígeno a pesar de su potencial terapéutico. Los pulsos eléctricos cortos que alteran temporalmente la permeabilidad celular ofrecieron una solución a este problema. Estos pulsos parecen inducir poros en la membrana celular, mejorando la entrada celular de fármacos y plásmidos. Los pulsos eléctricos de las células *in vitro* aumentaron la citotoxicidad de la bleomicina varios cientos de veces y mejoraron la citotoxicidad del cisplatino unas veintisiete veces. El primer estudio *in vivo* de esta técnica se llevó a cabo en 1997 en gatos con sarcoma de tejidos blandos recurrente después de la radioterapia adyuvante. Una pequeña cohorte de gatos recibió bleomicina seguida por pulsos rectangulares, con una supervivencia prolongada en 12 gatos con respecto a los 11 controles no tratados.

En un estudio de fase I/II posterior, los pacientes con sarcoma de tejidos blandos caninos y felinos se trataron con bleomicina intralesional acoplada con pulsos eléctricos bifásicos, dando como resultado una tasa de respuesta total del 80 %, incluyendo del 40 % con remisiones a largo plazo. Este estudio reveló que los hemangiopericitomas caninos respondieron particularmente a la electroquimioterapia (ECT, del inglés electrochemotherapy), pero también subrayó la necesidad del desarrollo de electrodos personalizados adaptados al tejido conjuntivo. Una serie de estudios de fase II se iniciaron posteriormente con los electrodos optimizados. Los gatos con sarcoma de tejidos blandos que recibían bleomicina intraoperatoria o postoperatoria con electroterapia mejoraron el tiempo medio de recurrencia de 12 a 19 meses respectivamente, en comparación con un promedio de 4 meses solamente con cirugía. Un estudio similar con pacientes caninos de sarcoma de tejidos blandos rindió un tiempo medio de recurrencia de 730 días y una tasa de respuesta del 95 % en perros tratados con bleomicina y pulsos eléctricos, con la mayor sensibilidad por los hemangiopericitomas. Una revisión de más de 370 especímenes de biopsias a partir de los ensayos ECT en una variedad de tumores mostró una fuerte correlación entre la supervivencia total y la necrosis ($p < 0,0001$) y las altas tasas de apoptosis ($p < 0,0001$).

El periodo y la frecuencia de los pulsos eléctricos también se optimizó a través de múltiples ensayos en animales de compañía, demostrando que disminuyendo el periodo de pulsos de 1 segundo a 100 milisegundos y aumentando la frecuencia de repetición de 1 Hz a 5000 Hz podría suministrar el campo eléctrico necesario de 400 V/cm al tumor con menos incomodidad para el paciente. Aunque los primeros estudios *in vivo* se iniciaron hace poco más de una década, la ECT ya está aprobada para su uso en seres humanos y se ha reintegrado en algunos países de la UE. Los ensayos clínicos de la ECT en pacientes veterinarios comenzó poco después de los primeros ensayos oncológicos en seres humanos, y se usa el enfoque extensamente en varios países europeos y en Brasil para gatos, perros y caballos con una amplia gama de tumores cutáneos y subcutáneos. La optimización de la técnica ha progresado en paralelo en ensayos clínicos en seres humanos y veterinarios, ejemplificando como las similitudes entre los tumores en seres humanos y animales de compañía y la comunicación entre los oncólogos que trabajan en ambos campos puede acelerar el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas.

Ejemplo 9 Tratamiento de los Hemangiosarcomas

Se probó el éxito de la muramil tripéptido fosfatidiletanolamina (L-MTP-PE) en ensayos clínicos aleatorios en osteosarcoma canino (anterior), y por lo tanto esta estrategia terapéutica se extendió al hemangiosarcoma. Se trató a treinta y dos perros con HSA y sin metástasis evidentes con una esplenectomía y doxorubicina + ciclofosfamida junto con L-MTP-PE o placebo. Los perros que recibieron L-MTP-PE mejoraron significativamente la supervivencia libre de tumor ($p=0,037$) y la supervivencia total ($p=0,029$), con mejores respuestas de los perros del estadio clínico I que los del estadio clínico II. El bioensayo mostró una elevación significativa del factor de necrosis tumoral y la interleucina-6, citocinas inmunitarias importantes. Estos estudios sugieren un nuevo enfoque terapéutico para esta necesidad médica no satisfecha en perros. Además, los estudios del HSA canino pueden informar de las estrategias anti-metastáticas para el tratamiento de animales de compañía y seres humanos.

Ejemplo 10 Estimulación con Plásmidos de ADN de la Inmunidad Innata y Adaptativa

Las células T activadas mediante los superantígenos bacterianos desarrollan una actividad citolítica fuerte y median una regresión tumoral cuando se transfieren adoptivamente. Veintiséis perros con melanoma maligno espontáneo se trataron con ADN plasmídico que codificaba el superantígeno bacteriano de la enterotoxina B de *Staphylococcus* y bien GM-CSF o IL-2 para ensayar el efecto de la vacunación con ADN en la regresión tumoral. La tasa de respuesta total (remisión completa y parcial) para todos los perros fue del 46 %, y fue la más alta en los tumores más pequeños. El examen histológico reveló los infiltrados de células T CD4+ y CD8+ en los tumores, y demostró que la regresión tumoral se correlacionó con altos niveles de linfocitos T citotóxicos circulantes. En este estudio, el plásmido de ADN formó un complejo con lípidos catiónicos para compactar el plásmido para una mayor estabilidad. Los estudios posteriores revelaron que la combinación de lípidos catiónicos y ADN bacteriano estimuló eficazmente la inmunidad innata y provocó una fuerte respuesta de citocinas incluso en la ausencia de los genes codificados.

Ejemplo 11 Desarrollo de Péptido-miméticos Antiangiogénicos de Trombospondina-1

Este ejemplo muestra como los tumores espontáneos en animales de compañía pueden desempeñar un papel clave estableciendo un puente entre el desarrollo terapéutico de los modelos en ratón hasta los ensayos clínicos en seres humanos. Dado que los tumores crecen, estos deben inducir la angiogénesis localizada para desarrollar un suministro de sangre adecuado que soporte su crecimiento adicional. Por lo tanto, el bloqueo de la angiogénesis es una meta de muchos de los esfuerzos en la terapia del cáncer. La trombospondina 1 (TSP-1) es un inhibidor natural de la angiogénesis pleiotrópico, que bloquea muchos aspectos de la activación de las células endoteliales. Los nonapéptidos modificados basados en el dominio angiogénico de TSP-1, ABT-526 y ABT-510, comparten su actividad antagonista en un tamaño más práctico para el desarrollo de fármacos. Los estudios de eficacia iniciales en modelos singéneos y de xenotrasplantes en ratón mostraron que tanto ABT-526 como ABT-510 ralentizaban el crecimiento tumoral. Sin embargo, es improbable que la inhibición de la angiogénesis destruya rápidamente los tumores, así que el establecimiento de la dosis para un ensayo clínico en seres humanos basado en el modelo de cáncer de progresión rápida en ratón no se consideró óptima. Para definir mejor la seguridad y la eficacia, los dos péptido-miméticos de TSP-1 se ensayaron en un ensayo no clínico abierto de tumores caninos espontáneos. Se llevó a cabo un ensayo prospectivo abierto en 242 perros con una variedad de cánceres que incluían NHL, sarcomas de tejidos blandos, adenocarcinoma mamario, carcinoma de cabeza y cuello, y muchos otros tumores primarios y metastáticos (115). Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo en una colonia de perros sabuesos de laboratorio, proporcionando un puente entre los estudios en ratón y en animales de compañía no consanguíneos y estableciendo los parámetros de dosis iniciales. No se observaron toxicidades limitantes de la dosis en ninguno de los perros del estudio. Se observó una regresión objetiva (> 50 % de reducción del tamaño tumoral) de las lesiones medibles en 19 de los 180 perros evaluables y se dio una estabilización significativa de la enfermedad en 23 perros. La mayor parte de estas respuestas se dieron 60 días después del tratamiento con el mimético de TSP-1, confirmando la selección de tumores espontáneos en perros como el modelo apropiado para optimizar la dosificación y confirmar la eficacia. Este estudio indicó que el NHL fue una de las clases de tumor más respondedoras y que ABT-526 fue más activo que ABT-510. Basándose en estos resultados, se llevó a cabo un ensayo controlado de doble ciego de ABT-526 en 94 perros de compañía con la primera recaída del NHL de origen natural. Este estudio se diseñó para proporcionar una definición adicional de la dosis biológica y el programa óptimo, identificar los marcadores predictivos de actividad y ensayar la eficacia de ensayo en combinación con la quimioterapia. Los perros recibieron Ionomustina (CeeNu®, Bristol Myers Squibb) y placebo o ABT-526. En este ensayo clínico controlado ABT-526 no aumentó el número de casos que responden a la quimioterapia, pero aumentó modestamente la duración de la respuesta. El ensayo de ABT-510 avanzó a una serie de ensayos clínicos de fase I y de fase II en seres humanos. Un estudio en fase I de la seguridad, la farmacocinética y la farmacodinámica de ABT-510 en 39 pacientes humanos de cáncer con una gama de cánceres avanzados demostró un perfil de toxicidad favorable y causó un descenso en el factor básico de crecimiento de los fibroblastos, un marcador de angiogénesis y enfermedad estable en 6 pacientes durante al menos 6 meses.

Ejemplo 12 Reducción de los Efectos Adversos del Doxil

La doxorubicina es un antibiótico de antraciclina que se intercala bloqueando la replicación de ADN, y se usa en el tratamiento de una amplia gama de cánceres incluyendo las malignidades hematológicas tales como el NHL y los sarcomas de tejidos blandos. El doxil, un liposoma pegilado que contiene doxorubicina, ha prolongado su circulación y potenciado su eficacia antitumoral con menos cardiotoxicidad. Sin embargo, al contrario que la doxorubicina libre, el Doxil induce una reacción cutánea dolorosa denominada eritodisestesia palmar-plantar (EPP), que algunas veces se denomina la enfermedad de mano-pie. Al igual que los seres humanos, los perros también son susceptibles del desarrollo de EPP después de la terapia prolongada con Doxil. Pruebas anecdóticas sugirieron que la vitamina B6 (piridoxina) oral podría aliviar o eliminar la EPP. Para ensayar esto, se llevó a cabo un estudio de doble ciego de la quimioterapia diaria con Doxil combinada con piridoxina oral o placebo en 41 perros con NHL (118). No se observó ninguna diferencia en las tasas de remisión entre los grupos de tratamiento, pero el riesgo de desarrollar EPP fue 4,2 veces mayor en el grupo placebo. Aunque la piridoxina no impidió o invirtió completamente la EPP, esta retrasó y atenuó los síntomas. Este ensayo exploratorio en perros proporcionó la justificación para un ensayo más extenso de esta estrategia en pacientes humanos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para identificar una combinación de agentes anticancerígenos con efectos sinérgicos que comprende (1) controlar un animal de compañía con un cáncer de origen espontáneo y al que se le han administrado dos o más agentes anticancerígenos con respecto a un efecto biológico y/o fisiológico; y (2) identificar una combinación de agentes anticancerígenos con efectos sinérgicos cuando los efectos biológicos y/o fisiológicos sean sinérgicos, donde los agentes anticancerígenos comprenden bisfosfonatos y CpG catiónicas.
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1 donde los agentes son clodronato y CpG catiónicas.
- 3.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el animal de compañía es un perro.
- 4.** El método de la reivindicación 3 donde el animal de compañía es un perro de raza pura.
- 15 **5.** El método de la reivindicación 3 donde el animal de compañía es un perro mestizo.
- 6.** El método de la reivindicación 3 donde el perro tiene unos antecedentes genéticos homogéneos.
- 7.** El método de la reivindicación 3 donde el perro tiene unos antecedentes genéticos heterogéneos.
- 20 **8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el animal de compañía es un gato.

Figura 1

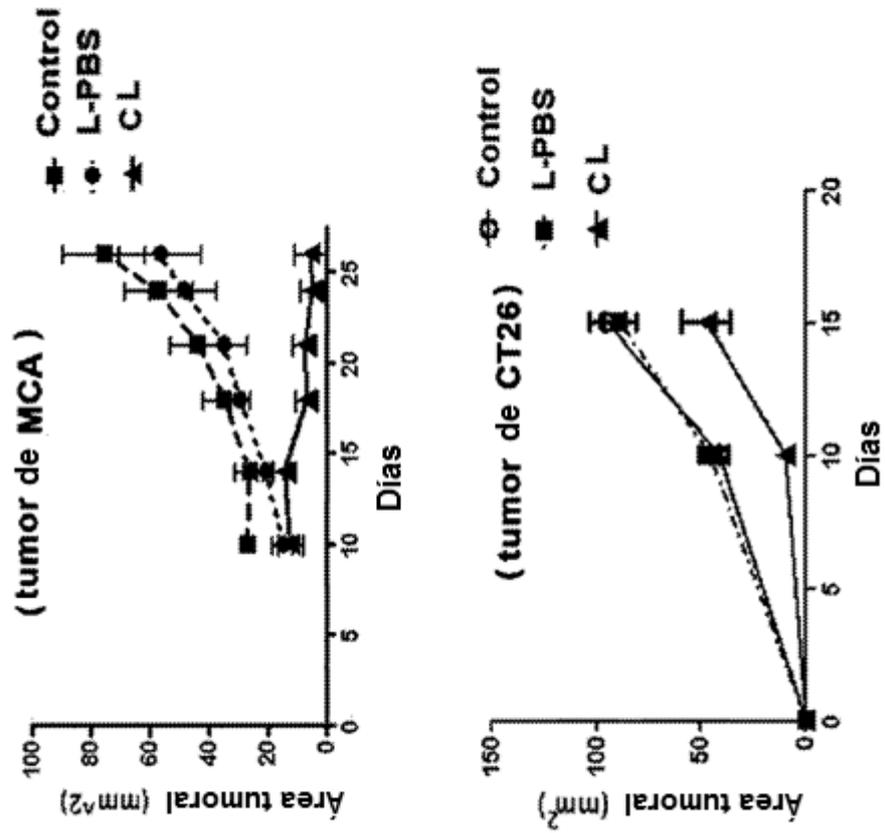


Figura 2

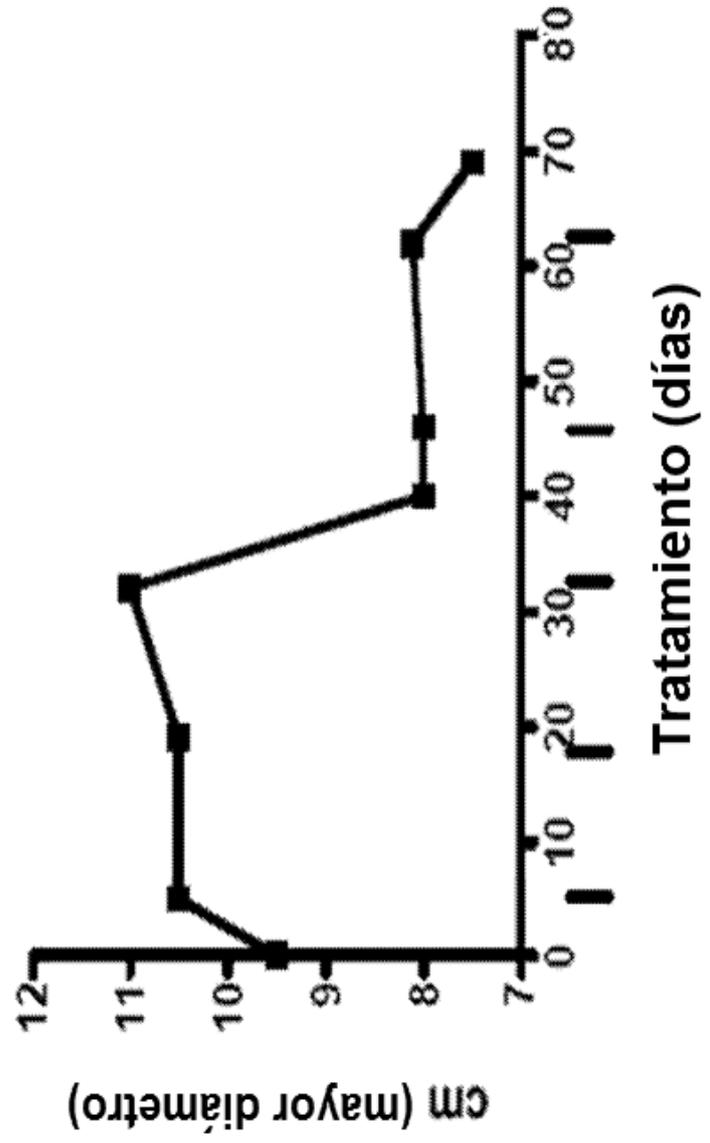


Figura 3

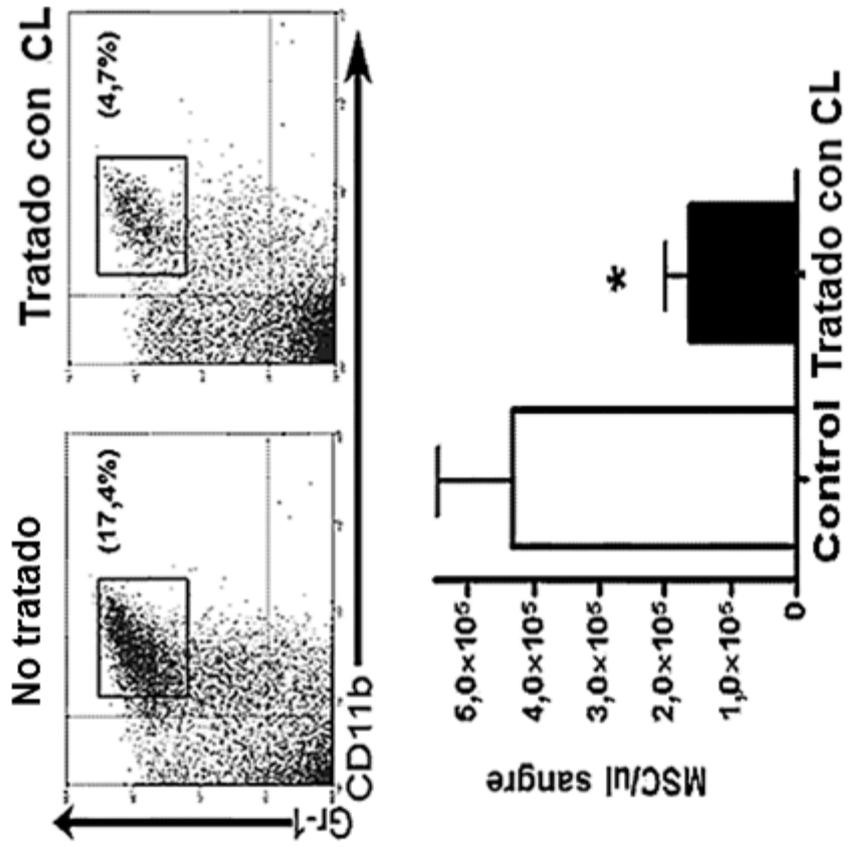


Figura 4

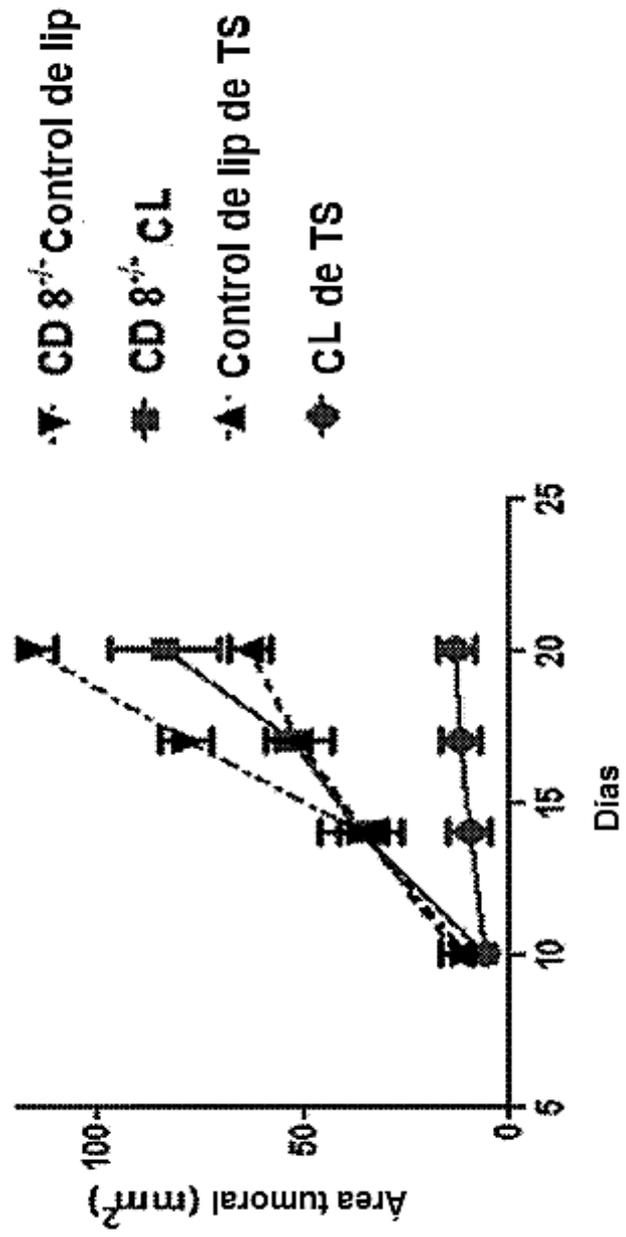


Figura 5

