

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 942**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010 E 10850617 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2564867**

54 Título: **Vacuna biológica autóloga contra el cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2016

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD MANUELA BELTRÁN (100.0%)
Avenida Circunvalar No. 60-00
8 Bogotá, CO

72 Inventor/es:

SEGURA PUELLO, HUGO RAMIRO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 568 942 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

Vacuna biológica autóloga contra el cáncer

5 Campo de la invención

El conocimiento desarrollado sobre el sistema inmunitario en el siglo veinte y en la actualidad, ha permitido su uso en el tratamiento contra el cáncer; así nos lo comunican científicos del mundo, indicando que se ha podido reactivar el sistema inmunitario con inmunoterapia, principalmente de vacunas con las que ha sido posible bloquear las células tumorales y proporcionar calidad de vida y supervivencia a los pacientes tratados con dichas vacunas. Se sabe también que los tratamientos convencionales tales como quimioterapia y radioterapia no "curan" el cáncer, sino que son terapias paliativas con muchos efectos secundarios en casi todos los sistemas corporales, provocando a su vez lo que se ha denominado el "segundo tumor" o metástasis y progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la inmunoterapia ofrece una nueva alternativa de tratamiento del cáncer, puesto que no genera los efectos secundarios de otros tratamientos. La inmunoterapia se considera como el cuarto tratamiento contra el cáncer.

Actualmente se conocen varios estudios sobre vacunas contra el cáncer y algunos en los que se utilizan antígenos tumorales extraídos a través del suero de pacientes con cáncer, con el fin de estimular el sistema inmunitario e inducir una respuesta inmunitaria específica contra las células tumorales.

Cada vacuna presenta determinados componentes en base al tipo de vacuna deseada: existen vacunas biológicas, sintéticas, genéticas, proteicas, antigénicas, de células dendríticas, etc.

Se cree que el mecanismo de acción de la vacuna puede incluir la inhibición de la enzima colagenasa empleada por las células tumorales para provocar la disolución del colágeno utilizada por todas las células para permanecer unidas. Otro mecanismo posible de acción es que aumentando la concentración de colágeno con la vacuna, se inhibe la enzima colagenasa y se bloquea la metástasis en otros órganos mediante las células tumorales.

La vacuna es un compuesto biológico que pretende reactivar y estimular las células del sistema inmunitario, los linfocitos B, los linfocitos T y los linfocitos CN para bloquear la metástasis de las células tumorales y reactivar la médula ósea deprimida por el mismo cáncer y por medio de los tratamientos convencionales, tales como quimioterapia y radioterapia.

35 Antecedentes de la invención

Actualmente, se han realizado estudios de investigación que buscan determinar el comportamiento del sistema inmunitario con el fin de buscar alternativas en la lucha contra las células tumorales. Entre los documentos del estado de la técnica relacionados con la presente invención destacan:

40 la solicitud de la patente Colombiana CO 5930064 que divulga la vacuna autóloga CIMT-54.

La solicitud de la patente Europea EP1523989 desvela composiciones y métodos para tratar y/o prevenir el cáncer en un animal. Se describen mejoras con el empleo de una vacuna en base a levaduras que comprende un vehículo de levaduras y un antígeno seleccionado para generar una respuesta inmunitaria humoral en el animal. Dicha vacuna comprende un vehículo de levaduras y una proteína de fusión expresada por el vehículo de levaduras que comprende: al menos un antígeno de cáncer y un péptido unido al extremo N-terminal del antígeno de cáncer. El péptido con una secuencia aminoácida establecida estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levaduras o previene las modificaciones de traducción de la proteína de fusión expresada.

50 Por su parte, la publicación WO2009/066824 desvela una vacuna profiláctica e inmunológica para terapia que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (CMIs) cargadas con el ligando del linfocito CN nativo y un antígeno para la prevención y tratamiento del cáncer, más precisamente una vacuna que comprende monocitos de CMI cargados con α -galactosilceramida y un antígeno para generar una respuesta inmunitaria específica. El antígeno se obtiene a partir del tumor y se expresa mediante transducción de un virus recombinante (adenovirus, retrovirus, virus vacuna, poxvirus, virus Sindbis). Entre los antígenos empleados se encuentran Her-2/neu, proteinasa 3, un gen asociado al tumor de Wilm, murinoglobulina, y otros.

La solicitud de la patente Europea EP 1576966 proporciona un método para la preparación de una vacuna. El método incluye: (1) analizar un antígeno específico de un patógeno particular; (2) obtener un polinucleótido codificante de un antígeno específico, (3) obtener una secuencia polinucleótida con una diferencia suficiente del polinucleótido, (4) preparar una vacuna utilizando la secuencia polinucleótida. La vacuna antitumoral corresponde en particular a una vacuna molecular EGFR, preparada a partir de una molécula EGRF como antígeno y proteínas, genes, virus o bacterias establemente transformados. Una de las funciones biológicas de las vacunas moleculares EGFR es que poseen un efecto antitumoral sobre una variedad de tumores sólidos en los que se sobreexpresa la molécula EGFR, es decir, cáncer de pulmón, de mama, de ovarios, de colon, de próstata y de estómago, entre otros,

comprendiendo además un efecto inmunológico protector e inhibición terapéutica de la metástasis. La vacuna genera una respuesta inmunitaria activa y pasiva por el organismo tratado.

5 La publicación WO 2004/0077334 se refiere a plásmidos construidos que expresan el gen Her-2/neu humano y poseen actividad anticancerígena y a una vacuna que comprende los mismos para prevenir y/o tratar el cáncer. Los plásmidos se utilizan como vectores que codifican antígenos asociados al tumor. El documento menciona que se generan fácilmente y son seguros para su administración. Dichos plásmidos se preparan insertando un gen HER-2/neu truncado carente de dominio intracelular en un plásmido pTV2 o pCK. Los plásmidos traducen adicionalmente un gen de citoquina. La vacuna comprende los plásmidos preparados, un transportador farmacéuticamente
10 aceptable y un gen de citoquina.

De manera similar, la publicación WO 2009/083202 se refiere a un parvovirus caracterizado por un genoma enriquecido en CpG, en el que el genoma contiene al menos 2 insertos CpG adicionales que no están presentes en el genoma natural, y el uso de un parvovirus en base a parvovirus H1, Lu III, virus minúsculo de ratón (VMR),
15 parvovirus de ratón (PVR), virus minúsculo de rata (VMR), virus de rata (VR), vectores en base a las especies previas y/o células capaces de producir de manera activa las especies anteriores para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento contra el cáncer, específicamente carcinoma pancreático, hepatoma o linfoma.

20 La solicitud de la patente de Estados Unidos US 2009/0117081 desvela que los parvovirus, tales como el virus adeno-asociado tipo 2 (VAA2), son oncolíticos, median de manera selectiva la apoptosis en las células cancerígenas y sus precursores, mientras dejan intactas las células sanas. Se desvela además una composición farmacéutica que comprende estos virus y un vehículo.

25 La solicitud de la patente EP 1523989 se refiere a un proceso para la preparación de una vacuna anticancerígena obtenida a partir de suero o leucocitos autólogos. El método de preparación incluye coagular una cantidad definida de sangre del paciente con cáncer que no se ha tratado con quimioterapia o radioterapia, centrifugar dicha sangre con una velocidad rotacional de al menos 2.000 rpm durante 30 segundos, combinar el suero sobrenadante con una solución acuosa de formaldehído a una temperatura de al menos 37 °C durante al menos 28 días, tratar el producto
30 de la etapa previa con ácido fosfórico, filtrar, tratar el precipitado con una solución acuosa de ácido clorhídrico para reducir el pH a 4, centrifugar el producto a una velocidad rotacional de al menos 2.000 rpm, recoger el precipitado, tratar y disolver el precipitado con una solución tampón para aumentar el pH a un valor fisiológico y repetir las últimas ocho etapas.

35 La solicitud de la patente Española ES2250226 reivindica el uso de parvovirus no patógenos para la preparación de un medicamento para reducir los efectos secundarios de las terapias con agentes genotóxicos en pacientes con enfermedades crónicas y/o consuntivas, la reducción de los efectos secundarios aparece con el mantenimiento o aumento de la dosis con agentes genotóxicos y los efectos secundarios afectan a los parámetros hematológicos.

40 En el estado de la técnica también se describen informes de las investigaciones realizadas por el Dr. Matthias Rath relacionadas con los mecanismos que emplea el cáncer para expandirse por el cuerpo y en particular con el mecanismo de la degradación del colágeno. Pese a que la técnica anterior ha buscado soluciones al problema técnico, que es proporcionar alternativas terapéuticas seguras y eficaces y sin los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y la radioterapia, no existen aún vacunas biológicas que, a partir del antígeno asociado al tumor
45 (obtenido del suero del paciente con cáncer) y adyuvantes tales como un virus ADN atenuado, específicamente un parvovirus y aminoácidos específicos, permitan no solo tratar el cáncer sin efectos secundarios sino que también inhiban la metástasis y proporcionen calidad de vida y supervivencia general.

En particular, es relevante mencionar que ninguna de las anterioridades referidas indica resultados experimentales o estudios clínicos que demuestren la eficacia de los métodos y vacunas en seres humanos. En cambio, se ha demostrado la eficacia de la vacuna de la presente invención en seres humanos como se mostrará posteriormente en los ejemplos. Por lo tanto, la vacuna de la presente invención proporciona las siguientes mejoras y ventajas con respecto a las vacunas convencionales de la técnica anterior:

55 1. Comprende el genoma del parvovirus (PVC-2) no patógeno y atenuado, que contiene genes para dirigir la producción de 4 o 5 proteínas, tres de ellas forman la cápside viral. Estos virus que solo poseen aproximadamente 5.000 nucleótidos son fáciles de secuenciar, de modo que es posible mapear nucleótidos; a partir de estas proteínas se produce una inmunidad celular activa.

60 2. Posee un antígeno que se extrae a través de la sangre del paciente (autólogo), cuya proteína tumoral se sobreexpresa, provocando una inmunidad humoral, con producción de anticuerpos (Ab).

3. No provocará daño alguno a las células sanas, aunque reaccionará específicamente contra las células tumorales.

65

4. Reactivará la médula ósea (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) deprimida por el cáncer y por los tratamientos tradicionales, demostrado en los estudios clínicos. Ha mostrado que puede reactivar las defensas (linfocitos T y B).

5. Presenta ciertos aminoácidos como adyuvantes que bloquearán la enzima colagenasa y/o aumentarán el colágeno degradado por las células tumorales, para a su vez regenerar los tejidos dañados por el mismo cáncer o por los tratamientos convencionales aplicados.

6. En los pacientes tratados con quimioterapia y/o radioterapia, la vacuna puede reducir los efectos secundarios provocados por dichos tratamientos tradicionales, mejorando la calidad de vida y supervivencia de los pacientes, demostrado en los estudios clínicos de pacientes tratados en estadios avanzados de la enfermedad.

7. A diferencia de otras vacunas, se ha ensayado en seres humanos en fases clínicas I y II, mostrando una seguridad del 98 % en los pacientes tratados. Solo se han descrito efectos secundarios leves, tales como irritación en el sitio de aplicación de la vacuna (no en todos los pacientes) y ligero eritema que disminuye tras unos minutos.

8. La vacuna ensayada en seres humanos en fase clínica II, a diferencia de otras vacunas presentadas, muestra una eficacia en tipos específicos de cáncer, tales como melanoma maligno, cáncer de mama, cáncer de próstata y cánceres hematopoyéticos, que resulta ventajoso, ya que no solo permite obtener una respuesta inmunitaria de tipo humoral (Ac), sino también produce una inmunidad celular activa específica contra las células tumorales, gracias a los componentes que constituyen la vacuna.

9. En los estudios de estadios I y II, se mostró que durante los 24 meses de estudio y tratamiento de los pacientes, se pudo dar a la mayoría de ellos calidad de vida (Karnofsky) y supervivencia, superando las expectativas dadas a los pacientes con los tratamientos convencionales.

Descripción de la invención

La vacuna de la presente invención comprende la mezcla de sustancias denominadas "adyuvantes inmunológicos" junto con el principio activo específico, una proteína sobreexpresada en las células cancerígenas, llamada antígeno asociado al tumor (AAT). Entre los adyuvantes se halla un parvovirus atenuado y los tres aminoácidos lisina, prolina y glicina que producirán una respuesta inmunitaria al estimular y aumentar las proteínas llamadas interferones (INF alfa y gamma), al igual que algunas citoquinas, tales como IL-2 que activan los linfocitos B, al producir una inmunidad humoral (anticuerpos) y celular, al aumentar los linfocitos T, Th (Lth1 y Lth2) que permiten la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC) y linfocitos CN, a partir del CMH I y II, con el fin de bloquear y llevar normalmente las células tumorales a la apoptosis. Se ha mostrado que en el suero de los pacientes con cáncer se encuentra entre el 70 % y 90 % de las proteínas tumorales sobreexpresadas.

Se ha descubierto que la vacuna de la invención reactiva el sistema inmunitario y bloquea las metástasis en los estadios tempranos del cáncer. De manera similar, provoca una respuesta inmunitaria contra las células tumorales y da lugar a la producción de nuevas células de defensa, tales como linfocitos B (inmunidad humoral) y linfocitos Tc, Th y CN (inmunidad celular). Adicionalmente bloquea el crecimiento y la diseminación (metástasis) de las células tumorales al inhibir la producción de la enzima colagenasa, que provoca las metástasis de las células malignas a otros tejidos, o porque reactiva la producción de colágeno, que es el responsable de mantener las células normales y tumorales unidas entre sí.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de varias dosis de la vacuna, específicamente entre 1 y 10 dosis durante 24 meses de tratamiento, muestran que la vacuna de la invención es capaz de reactivar la médula ósea a medio y largo plazo y es capaz asimismo de inhibir el crecimiento tumoral cuando aún no se ha introducido otro tratamiento. Adicionalmente, se ha observado que igualmente ayuda a disminuir los síntomas producidos por las terapias tradicionales, tales como quimioterapia y/o radioterapia.

Se ha mostrado además que la vacuna mejoró la calidad de vida y supervivencia general de los pacientes incluso más allá de lo pronosticado por el tratamiento convencional según el tipo de cáncer en el periodo de tratamiento, y en particular para el cáncer de tipo melanoma, cáncer de mama, leucemias y linfomas. Los resultados estadísticos permiten concluir que la vacuna es segura y eficaz.

Descripción detallada de la invención

El diseño y desarrollo de la vacuna comenzó con los estudios preclínicos en animales experimentales, ratas Wistar y algunos otros roedores más pequeños, en los que se realizaron ensayos de toxicidad en vacunas (seguridad) y eficacia ante ciertos tipos de tumores humanos recreados o reproducidos en animales.

También se realizaron algunos estudios de citotoxicidad en linfocitos humanos sanos para ensayar la seguridad de la vacuna según la dosis aplicada. En primer lugar, se buscó un prototipo de proteína viral que no fuera dañino para

5 el hombre, y que a su vez fuera capaz de estimular la producción de proteínas llamadas interferones (INF alfa, beta y gamma). En segundo lugar, se buscaron aminoácidos para bloquear de manera específica las células tumorales sin dañar las células normales, para que estas células tumorales alcancen la apoptosis. Los estudios realizados han permitido observar la regresión tumoral y el bloqueo de la metástasis en algunos tipos y estadios de cáncer, lo que corrobora la eficacia y la seguridad de la vacuna a nivel humano.

Los componentes esenciales de la vacuna de la invención son:

10 1. Un componente activo denominado antígeno asociado al tumor (AAT) presente en el suero de los pacientes diagnosticados con cáncer en una concentración de 70 a 90 %.

15 2. Una proteína viral atenuada, un preparado vacunal de parvovirus, que no daña a los seres humanos, aunque sirve para estimular los INF alfa y gamma. Se pretende bloquear el ADN de la célula tumoral y producir nuevas proteínas que son capaces de reactivar los linfocitos T para que aprendan a reconocer y a atacar solo las células tumorales, respetando las células sanas del paciente con cáncer.

20 3. Los otros componentes corresponden a los aminoácidos de lisina, prolina y glicina que forman la estructura principal del colágeno y sirven para renovar el colágeno perdido y dañado por las células tumorales, o para inhibir la enzima colagenasa, responsable de disolver el colágeno y producir la metástasis.

Posible mecanismo de acción de la vacuna:

25 Un posible mecanismo de acción de la vacuna es la reactivación del sistema inmunitario de las células dendríticas halladas en la piel (sitio de aplicación de la vacuna) y consideradas como células presentadoras de antígeno (CPAs). Estas células estimularán los linfocitos Th1 activando la producción en la médula ósea de glóbulos rojos y blancos y algunas citoquinas, tales como IL-2, FNT, e INF entre otros, e inhibiendo a través de Th2s, otros factores tales como IL-6 e IL10. Mediante la acción de este estímulo y a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II, se envía un mensaje por medio de los linfocitos T auxiliares (Th) y los linfocitos T citotóxicos (LTC) para que sean capaces no solo de identificar el péptido dado, sino también de inducir apoptosis de las células tumorales. De manera similar, presentando el antígeno (Ag) asociado al tumor, se producirán nuevos anticuerpos por acción de los linfocitos B, responsables de provocar una respuesta humoral.

35 Se sabe que una vacuna es una sustancia capaz de provocar una respuesta inmunitaria. De forma similar, una vacuna autóloga corresponde a una vacuna preparada a partir de componentes del mismo organismo a tratar.

Según lo anterior, se realiza que los componentes de la vacuna comprenden específicamente:

40 1. Un solvente, particularmente agua destilada (H₂O).

2. Un componente activo, antígeno asociado al tumor (AAT), para cada tipo de cáncer.

45 3. Un virus ADN atenuado, del tipo parvovirus de un preparado vacunal. El PVC-2 es un virus con ADN que contiene genes para dirigir la producción de 4 o 5 proteínas, tres de ellas forman la cápside viral. Estos virus que solo tienen aproximadamente 5.000 nucleótidos son fáciles de secuenciar, por lo tanto es posible mapear nucleótidos, según el conocimiento del experto en la materia. El virus no puede transmitirse a los seres humanos o a otros animales.

50 4. El aminoácido esencial es lisina y los aminoácidos no esenciales son prolina y glicina.

Método de preparación

Según la descripción previa, el método de obtención de la vacuna comprende las siguientes etapas:

- 55 - Obtener el antígeno asociado al tumor: a partir de un tratamiento realizado en la sangre del paciente con cáncer, que incluye coagulación, centrifugación, lavado, extracción y filtración de la suspensión obtenida, es posible obtener el antígeno asociado al tumor, en función del tipo del cáncer del paciente.
- 60 - Obtener una vacuna con virus ADN atenuado: el virus utilizado para la preparación de la vacuna de la presente invención forma parte de la familia de los picornavirus, denominada Parvovirus (del latín: *parvulus*: pequeño y *viridae*: virus). Obtener un preparado vacunal a partir de dicho virus incluye asepsia y antisepsia del mismo para su adición posterior.
- Introducir agua destilada y desionizada en un recipiente con agitador magnético.
- Centrifugar.
- 65 - Añadir uno a uno, o al mismo tiempo, los aminoácidos esenciales y no esenciales al agua destilada en las cantidades deseadas.
- Añadir el preparado vacunal viral.

- Añadir el antígeno asociado al tumor.
- Filtrar y enfriar.

Ha de mencionarse que cada uno de estos pasos puede llevarse a cabo por un experto en la materia en base a sus conocimientos y según los ejemplos expuestos a continuación.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Sin embargo, ha de entenderse que estos no son limitativos, según el conocimiento de un experto en la materia.

10

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE LA VACUNA

Obtención del antígeno asociado al tumor

15 Se trata la sangre de los pacientes con cáncer, de la siguiente manera:

a. Se extraen 4 mililitros de sangre periférica del paciente en una tapa de tubo amarilla que contiene un gel separador de células sanguíneas y se dejan 1 hora para que coagulen.

20

b. A continuación se centrifugan a 2.000 rpm durante 15 minutos para separar las células sanguíneas del suero y se extrae 1 mililitro del suero envasándolo en un tubo Ependorf; después se lleva al frigorífico (no al congelador) a -4 °C durante 3 días.

25

c. Después se lava el suero con agua destilada, se centrifuga de nuevo a 2.000 rpm durante 15 minutos, tres veces.

d. El sobrenadante, que contiene la mayor parte de proteínas, se suspende en la solución y se eliminan 0,2 microlitros de la suspensión con una micropipeta de 5 microlitros.

30

e. Por último, se realiza una filtración con un filtro millipore de 0,22 micrómetros para eliminar cualquier impureza en el suero.

35

f. Una vez filtrado, es necesario que el suero obtenido se envase en un tubo Ependorf para preparar posteriormente la vacuna autóloga para cada paciente según su tipo de cáncer.

Conviene observar que una parte de ese suero en sangre centrifugado, lavado y filtrado se envía a química sanguínea para cuantificar la proteína y de esta forma saber el nivel de antígeno en la muestra enfiada.

Preparación del virus ADN atenuado

40

Como se ha indicado previamente, el virus utilizado en la vacuna de la presente invención forma parte de la familia de los picornavirus, denominada Parvovirus (del latín: *parvulus*: pequeño y *viridae*: virus).

45

El virus se adquiere comercialmente como preparado vacunal, que contiene la vacuna viva atenuada patentada de la cepa C 154. Esta cepa muy inmunogénica presenta un nivel elevado del antígeno parvovirus, que tiene la ventaja de una fuerte respuesta de linfocitos B y T.

50

Una vez adquirido el preparado vacunal de parvovirus (PVC), anterior a asepsia y antisepsia, se extraen 0,20 ml de dicha vacuna con una micropipeta de 100 microlitros, para añadirse a los 100 mililitros de solución de agua destilada y desionizada que se encuentra en un recipiente, con el agitador magnético disolviendo los otros componentes. Se aplican 0,20 mililitros del preparado vacunal para disolverse así en la solución, durante la hora que dura el proceso. A continuación se filtra dicha solución con un filtro tipo millipore de 0,22 micrómetros para eliminar cualquier residuo que permanece en la solución; este proceso se realiza dos veces para garantizar la pureza de la preparación y la calidad del producto.

55

Preparado vacunal

60

1. Recoger 100 mililitros de agua destilada y desionizada en un recipiente de 200 ml e introducir un agitador magnético para centrifugar a 500 rpm todos los componentes que se van a añadir en la preparación de la vacuna.

65

2. Mientras tanto, se recogen los tres aminoácidos esenciales y no esenciales, uno a la vez, en la balanza analítica de la siguiente manera: el primer aminoácido no esencial es glicina y se recogen entre 500 y 700 miligramos; el segundo aminoácido esencial es lisina y de este componente se recogen entre 250 y 500 miligramos; el tercer aminoácido no esencial es prolina y se recogen entre 250 y 350 mg, preferentemente 700 mg de glicina, 400 mg de lisina y 300 mg de prolina.

Se añaden uno a uno al agua destilada que se está centrifugando o pueden mezclarse entre sí hasta producir una solución completa para disolver los solutos en el disolvente. Esta solución se deja centrifugando durante al menos una hora, hasta que la solución sea homogénea.

3. Una vez mezclados los tres aminoácidos, se aplican entre 200 y 300 microlitros (0,2 a 0,3 ml) del preparado vacunal atenuado viral denominado PVC-2 (proteína viral), preferentemente 0,2 mililitros.

4. Por último, se añade el antígeno asociado al tumor, extraído del suero del paciente con cáncer: se ha demostrado que dicho antígeno es circulante al 70 a 90 % en sangre periférica. Se recogen entre 0,1 y 0,3 mililitros de dicho antígeno, preferentemente 0,2 mililitros según el tipo específico de cáncer, provocando que cada vacuna se denomine autóloga, es decir, se prepara a partir de las mismas proteínas del paciente. Dicho antígeno una vez extraído se mezcla con la solución, permitiendo la obtención de una única solución que servirá como preparado vacunal.

Antes de envasar la vacuna se filtra todo el preparado con el fin de purificar la solución para que no queden residuos, y a continuación se enfría en el frigorífico a -4 grados centígrados, dando lugar a la vacuna activa autóloga específica para cada tipo de cáncer.

EJEMPLO 2 ESTUDIO DE TOXICIDAD DE LA VACUNA EN ESTUDIOS PRECLÍNICOS

ANÁLISIS Y RESULTADOS DE TOXICIDAD EN EL ESTUDIO PRECLINICO *IN VIVO* DE LA VACUNA EN RATAS WISTAR

Para el estudio de toxicidad *in vivo*, se recogió una población de 60 ratas Wistar, clasificadas en cinco grupos cada uno con cinco machos, cinco hembras, un macho control y una hembra control, como se muestra en la Tabla 1.

En los cinco grupos (12 ratas por grupo, véase la Tabla 1) se realizó el estudio de seguridad de la vacuna durante un periodo de 90 días, variando la dosis en cada grupo. Para cada grupo, las dosis eran 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 ml, respectivamente. Se aplicaron tres dosis a cada animal experimental, una dosis cada 10 días.

El grupo control se inoculó con solución salina fisiológica (SNN) con la dosis correspondiente para cada grupo. Todos los animales eran ratas Wistar certificadas obtenidas del estabulario del Instituto Nacional de Salud (INS).

Las características de los animales experimentales son:

Condición de los animales	saludable	Peso medio	200 gramos
Edad media	3 meses	Altura media	20 centímetros

El análisis y síntesis de los datos del estudio de toxicidad *in vivo* se realizaron empleando como herramienta las tasas porcentuales y la observación diaria en el bioestabulario, durante periodos de 10 horas diarias.

Se realizó el análisis por patología de los bloques de órganos para verificar la toxicidad de la vacuna. Para el análisis de los datos se considera el 100 % como la actividad normal diaria de los animales en cautividad.

A continuación se muestra el análisis de los datos y posteriormente las tablas y gráficas de datos correspondientes.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el estudio de toxicidad de la vacuna se analizaron los datos obtenidos de los cinco grupos de animales, con los siguientes resultados:

Grupos 1, 2 y 3: En los animales experimentales de estos grupos con dosis de 0,1; 0,2 y 0,3 ml, respectivamente, no se detectaron cambios en la fisiología (véanse las Tablas 2-7).

Grupo 4: En los animales experimentales del grupo 4 (dosis de 0,4 ml), según la información obtenida por la observación diaria y teniendo en cuenta que el estado normal del comportamiento sexual del animal es de cinco cópulas, se observó una disminución en la actividad sexual, reduciéndose su número de cópulas a una. (5 cópulas se consideran el 100 %). El sesenta por ciento de los machos presentó disfunción eréctil condicionada. En aspectos como el apetito (ingesta de alimentos), este se redujo al 85 %, el consumo de agua se redujo al 72 % y la vida sexual se redujo al 15 %.

En las hembras, aspectos tales como apetito, consumo de agua y la actividad sexual se vieron igualmente afectados en relación al grupo de machos.

Para los resultados previos, véanse las Tablas 8-11 y Figuras 1-5.

Grupo 5: En este grupo de animales, inoculado con dosis de 0,5 mililitros, según la información obtenida por la observación diaria y teniendo en cuenta que el estado normal del comportamiento sexual del animal es de cinco cópulas, se observó una disminución en la actividad sexual, reduciéndose su número de cópulas.

En aspectos como el apetito, este se redujo al 80 %, el consumo de agua se redujo al 57 % y la vida sexual se redujo al 10 %. En las hembras de este grupo, se observaron cambios patofisiológicos en ovarios en un 40 %, se redujo la función uterina (procreación) en un 20 % y se vio afectada la fertilidad. En las hembras, aspectos como el

5 Según lo anterior, se muestra que dosis superiores a 0,3 mililitros exhiben alteraciones en los órganos reproductores tanto de machos como de hembras y variación en el comportamiento normal del animal, tal como consumo de alimentos, agua y actividad reproductora.

10 Para los resultados previos, véanse la Tabla 12 y las Figuras 6 y 7.

EJEMPLO 3: ESTUDIO DE LA EFICACIA DEL ESTUDIO PRECLÍNICO *IN VIVO* DE LA VACUNA EN RATAS WISTAR

15 Se indujeron algunos tumores sólidos (carcinomas) y hematopoyéticos (leucemias y linfomas) de células cancerígenas humanas (xenotransplante) en ratas, confirmando que las ratas tratadas a una dosis de 0,2 ml mostraron regresión tumoral, lo que indica la eficacia potencial de la vacuna en algunos de los tumores inducidos que dan lugar a la supervivencia y calidad de vida de los animales tratados.

20 El estudio consistió en tres grupos de ratas Wistar, cada uno consistía en dos hembras y dos machos, dos de esos grupos se denominaron experimentales y uno un grupo control. El estudio se realizó en 12 ratas, 6 hembras y 6 machos, con edad media de 2 a 3 meses, con un peso medio de 50 a 60 gramos y un tamaño medio entre 20 y 25 cm; todos los animales se encontraban sanos y bien alimentados al inicio del estudio (véanse las Tablas 13 y 14).

25 Se aplicaron tres dosis de células tumorales a niveles del miembro inferior de cada animal por vía intramuscular (IM), con un intervalo de 10 días entre cada dosis. Tras la observación diaria durante 6 semanas, se sacrificaron 3 ratas, dos machos y una hembra del grupo experimental, enviando los bloques de órganos a patología para comprobar si se había desarrollado el cáncer, con los siguientes resultados:

- 30 a. Hiperplasia endometrial, acorde con adenocarcinoma bien diferenciado.
 b. Hiperplasia linfoide, defensas bajas, posible resultado de leucemia.
 c. Hiperplasia nodular, defensas bajas.
 d. Hiperplasia linfoide.
 e. Médula ósea hiperplásica, fase de reacción leucémica.
 35 f. Endometrio con cambios de displasia y áreas indicativas de carcinoma.
 g. Ganglios linfáticos con hiperplasia moderada, mucosa gástrica hiperplásica, hiperplasia linfoide de colon.

40 Durante el periodo de observación de los animales inoculados con células cancerígenas humanas (grupo experimental y grupo de control), se observó un deterioro significativo de estos, tal como atrofia tisular (caquexia), desnutrición moderada a severa, pérdida de peso, caída del pelo, astenia, adinamia y muerte.

45 Una vez confirmado el resultado por patología del proceso cancerígeno, los Grupos 1 y 2, concebidos experimentales, se iniciaron con el programa de vacunación con una dosis de 0,2 ml de vacuna por vía subcutánea en tres dosis con un intervalo de 10 días entre las dosis. A las ratas del control se les administró una solución salina fisiológica con el mismo número de dosis durante el mismo periodo. A continuación se inició un periodo de observación de 30 a 60 días, que mostró:

- 50 1. Regeneración del pelo.
 2. Mejora del estado nutricional.
 3. Mejora de la actividad física.
 4. Disminución de tumores.
 55 5. Mejora en la calidad de vida.
 6. Se logró una supervivencia más allá del tiempo estipulado.
 7. Tras realizar la extracción del tumor en algunos de los animales, se evidenció necrosis (angiogénesis) y encapsulado de los vasos que irrigan el tumor.
 60

Los resultados obtenidos con la vacuna tras la reproducción de células tumorales en los animales experimentales mostraron que:

- 65 1. Es posible reproducir células tumorales por xenotransplante.

2. Si bien no se alcanzó a un estadio avanzado de cáncer en la muestra experimental, se demostró el proceso de inducción del mismo en los animales.

5 3. Tras demostrar el cáncer a partir del estudio histopatológico, la vacuna actuó eficazmente bloqueando la progresión de esta enfermedad e inhibiendo el fallecimiento temprano del animal.

4. Fue posible confirmar la supervivencia de los animales tratados con la vacuna.

10 5. Es posible tratar el cáncer en estadios tempranos (I-II).

6. La vacuna es capaz de encapsular tumores sin permitir la metástasis.

7. Es posible proporcionar calidad de vida y supervivencia a los animales afectados por dicha enfermedad.

15 8. Las ratas vacunadas sobrevivieron más allá de 24 meses, tiempo de esperanza de vida normal de una rata.

9. Las ratas mejoraron su estado nutricional.

20 10. Las ratas muertas (2) eran las ratas de control, que siguieron el proceso carcinogénico y a las que no se les inició ningún tratamiento contra la enfermedad.

25 11. En total, sobrevivieron 5 ratas experimentales, 2 machos y 3 hembras. Se sacrificaron dos machos y una hembra para enviarlos a patología y 2 ratas de control murieron durante el estudio, quedando solo dos que sobrevivieron durante algún tiempo, gracias a la alimentación suministrada.

30 12. El estudio de eficacia permite concluir que la vacuna actúa como estímulo para la reactivación del sistema inmunitario afectado por el cáncer y que es capaz de bloquear las células cancerígenas, (véase el artículo, Segura H, "Immunotherapy: Adjuvant in the Treatment of Melanoma", Estudio Piloto, en Scientific Threshold. n.º 7 (diciembre), págs. 72-76.

13. Por último, se mostró que los animales con una buena alimentación podrían alcanzar una supervivencia general.

35 La representación de los resultados previos puede observarse en las Figuras 8 a 17.

Los criterios de evaluación de la OMS para el estudio en fase clínica de pacientes con cáncer son:

Mejora

40 Respuesta clínica parcial $\geq 25\%$ y/o $\geq 50\%$.

Desaparición completa de las lesiones.

45 Respuesta clínica completa del 100 %.

Estable

Progresión de la enfermedad $\leq 25\%$

50 Deterioro

Progresión de la enfermedad $> 25\%$ en el paciente y/o aparición de nuevas lesiones.

55 EJEMPLO 3: FASES CLÍNICAS I Y II DEL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER CON LA VACUNA.

60 Tras obtener los resultados en los estudios preclínicos, el comité de ética de la UMB aprobó el estudio clínico de pacientes con cáncer. Un consentimiento previamente informado permitió reclutar cuatro pacientes para el estudio del caso con diferentes tipos de cáncer y en diferentes estadios, estos quisieron formar parte voluntariamente del estudio de la vacuna contra el cáncer. Dos de ellos, una paciente con cáncer de mama en estadio III y otra paciente con cáncer de ovarios en estadio IV, ya se habían tratado con quimioterapia y radioterapia varias veces sin una respuesta favorable; por el contrario, su estado general se deterioraba y el cáncer progresaba. Estas dos pacientes pudieron obtener calidad de vida y supervivencia durante más de dos años.

65 Otro paciente padecía cáncer de piel de tipo melanoma en estadio II. Dos de sus familiares habían fallecido meses antes por la misma enfermedad, con complicaciones en quimioterapia y radioterapia. Por lo tanto, el paciente decidió

someterse a la aplicación de la vacuna, sin utilizar ningún otro tratamiento. Hoy en día, ha completado cinco años asintomáticos con calidad de vida, sin que el cáncer progrese.

Otro paciente con un sarcoma pleomórfico de alto grado de malignidad en la pierna izquierda se le sugirió someterse a cirugía para iniciar el tratamiento con la vacuna, ya que no aceptaba los tratamientos convencionales. A este paciente se le declaró terminal debido al tipo de tumor y se le dio solo un mes de vida. Con la vacuna se logró una supervivencia de cuatro años con calidad de vida; más tarde el tumor entró en progresión, probablemente debido a que durante el último año, se le convenció someterse a quimioterapia y radioterapia, finalizando su calidad de vida y finalmente fallecer.

Tras observar en estos pacientes que la vacuna era segura y eficaz, se decidió reclutar pacientes designados "compasivos", que fueron aprobados por el comité de ética de la UMB: estos eran pacientes que la medicina tradicional había declarado terminal. El tratamiento con la vacuna permitió una mejor calidad de vida para la mayoría de ellos, por lo que se observó que la vacuna es más eficaz en ciertos tipos de cáncer. Adicionalmente, se logró una mayor supervivencia que la pronosticada por la medicina tradicional para dichos casos.

Tras los estudios y observaciones previos, se decidió iniciar un estudio en fase clínica I y II reclutando pacientes con cáncer en todos los estadios y de todos los tipos, para observar más claramente en qué tipos de cáncer la vacuna funcionaba mejor. Se observó que en cuatro tipos de cáncer: cáncer de piel melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata y linfomas, la vacuna mostró mejores resultados. Por lo tanto, el estudio señala a estos cuatro tipos de cáncer y la observación de los resultados en 24 meses.

Los resultados de los estudios previos se ilustran en las Gráficas 18 a 44 y en la Tabla 15, como se detalla a continuación.

Gráficas 18 y 19. Estudio en fase clínica II que muestra el porcentaje de pacientes que han tenido tratamientos previos a la vacuna y el número de tratamientos previos a la vacuna.

Gráfica 20. El estudio de investigación con la vacuna ha demostrado que el mayor número de pacientes tratados se encuentran en estadios III y IV avanzados y metástasis. De ahí la importancia de la respuesta clínica a la vacuna en pacientes declarados terminales.

Gráfica 21. La gráfica muestra los diferentes tipos de cáncer tratados con la vacuna, así como el estadio en el que se encuentran los pacientes.

Gráfica 22. Los resultados de seguridad de la vacuna en pacientes vacunados, muestra que los efectos secundarios observados se consideran leves y agudos; aunque el 83 % de los pacientes no mostró ningún efecto secundario en relación a la pequeña proporción de pacientes que tuvieron algún tipo de reacción. Cabe señalar que algunos de los efectos secundarios no deseados por los pacientes, tales como náuseas y abatimiento, coinciden con los tratamientos previos antes de la aplicación de la vacuna. Es preciso señalar en las gráficas previas que la mayor parte de los pacientes recibieron otros tratamientos, lo que implicaría volver a evaluar estos efectos secundarios con la vacuna.

Gráfica 23. El estudio mostró que el 76 % de los pacientes permanecieron estables, es decir, sin progresión de la enfermedad o sus lesiones no aumentaron más del 25 % de su estado inicial durante el tratamiento con la vacuna y el 9 % mejoró, es decir, sus lesiones tumorales disminuyeron o desaparecieron durante el tratamiento, proporcionándoles calidad de vida y supervivencia más allá de lo pronosticado por los tratamientos convencionales. Sin embargo, el 14 % continuó en progresión es decir, el cáncer se expandió debido a su estadio avanzado o porque la vacuna no pudo bloquear de manera definitiva la metástasis.

Tabla 15 Estudio comparativo de un CHC de un paciente con leucemia linfocítica aguda, antes y después del tratamiento con la vacuna.

Gráficas 24 y 25. Se observa la fuerte disminución de los leucocitos (leucopenia) tras aplicar quimioterapia, y cómo se reactiva y se mantiene normal durante la vacunación.

Gráfica 26. Se puede observar que los leucocitos se mantienen en un estándar normal, haciendo que la médula ósea se mantenga generalmente activa tras la vacunación durante los 24 meses de tratamiento.

Gráfica 27. Se puede observar que los niveles de hemoglobina del paciente se mantienen durante el tratamiento con la vacuna, que muestra que activa la médula ósea madurando las células de la serie roja y blanca.

Gráficas 28 y 29. De manera similar, se mantiene la actividad de las células de la serie roja, permanecen maduras durante la duración del tratamiento, a diferencia de los tratamientos convencionales que disminuyen dichos niveles en sangre.

Gráfica 30. Se puede observar cómo la vacuna favorece los niveles en sangre de la médula ósea y produce células maduras sanas.

5 Gráficas 31 y 32. De manera similar, se observa que todas las células producidas en la médula ósea, incluyendo plaquetas, presentan el mismo comportamiento y su número permanece sin cambios; al contrario, los niveles en sangre se mantienen en el intervalo normal, implicando que la vacuna no solo es eficaz, sino que regenera asimismo y mantiene el sistema hematopoyético de la médula ósea.

10 Gráfica 33. Se muestra que la incidencia anual de cáncer es mayor en las mujeres que en los hombres.

Gráfica 34. La evolución clínica de los pacientes estudiados mostró que era posible proporcionar estabilidad durante la duración del tratamiento (24 meses), teniendo en cuenta que la vacuna no permitió que sus lesiones progresaran a pesar del estadio en que se encontraban.

15 Gráfica 35. Se puede observar en esta gráfica que se produjo una mejora clínica en los estadios III y IV más avanzados tras la aplicación de la vacuna, implicando que la vacuna era eficaz en determinados tipos de cáncer avanzados.

20 Gráfica 36. Se puede observar en esta gráfica que un gran porcentaje de pacientes tratados con la vacuna permaneció clínicamente estable durante la duración del estudio (24 meses), teniendo en cuenta que su enfermedad no progresó más del 25 %, ni sus lesiones crecieron más de ese porcentaje, proporcionándoles calidad de vida y supervivencia; sin embargo, un pequeño porcentaje de pacientes progresó, es decir, la enfermedad progresó en comparación a otro pequeño porcentaje para el que las lesiones disminuyeron o mejoraron y por lo tanto su calidad de vida mejoró significativamente.

25 Gráficas 37 y 38. Los resultados del antígeno (marcador tumoral) antes y durante el tratamiento mostraron que se mantuvo estable para una gran proporción, es decir, no aumentó. Esto implica que la enfermedad no progresó, mientras que en un porcentaje inferior se mantuvo activo, es decir, la enfermedad progresó. Para otro pequeño porcentaje, se estabilizó el antígeno. Por lo tanto, la enfermedad dejó de estar activa.

30 Gráficas 39 y 40. Se observó durante el estudio del diagnóstico por imágenes que el 76 % de los pacientes permaneció estable, implicando que la enfermedad no avanzó, mientras que el 15 % mejoró, es decir, las lesiones disminuyeron en tamaño o desaparecieron y un 9 % progresó.

35 Gráfica 41. Tras el tratamiento con la vacuna, durante los 24 meses, las pacientes con cáncer de mama permanecieron clínicamente estables, su antígeno avanzó y las imágenes por diagnóstico no disminuyeron.

40 Gráfica 42. Se puede observar que los pacientes con cáncer de próstata permanecieron clínicamente estables durante la duración del tratamiento, mientras que el antígeno mejoró, es decir, se normalizó. Esto implica que tanto su enfermedad como las imágenes por diagnóstico permanecieron estables, es decir, sus lesiones no siguieron aumentando.

45 Gráfica 43. El tratamiento con la vacuna en pacientes con linfoma de Hodgkin (LH) y de no Hodgkin (LNH) mostró que los pacientes permanecieron estables en la enfermedad, mejorando sus imágenes por diagnóstico en relación al antígeno y a la calidad de vida que llevaban.

50 Gráfica 44. Los pacientes con cáncer de piel melanoma maligno, el segundo cáncer más agresivo y los cánceres basocelular y escamocelular celular tratados con la vacuna mostraron estabilidad clínica. Las imágenes por diagnóstico durante el estudio y tratamiento con la vacuna no mostraron progresión del cáncer.

De todo lo anterior, puede concluirse generalmente que:

1. Existe un bloqueo de la metástasis (verificado en pacientes tratados con la vacuna).
2. Se reactiva el sistema inmunitario (confirmado por ensayos de laboratorio).
3. Existe regresión tumoral (verificada por el aspecto clínico y diagnóstico por imágenes).
4. Se mejora la calidad de vida de los pacientes (Karnofsky 90 % a 100 %).
5. Mejora de la supervivencia (la esperanza de vida superó los tratamientos convencionales).

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna biológica autóloga para su uso en un método para tratar el cáncer, caracterizada por que comprende:
- 5 - un antígeno asociado al tumor de sangre extraída de un paciente con cáncer;
 - un disolvente;
 - un parvovirus atenuado; y
 - tres aminoácidos, en los que uno de los aminoácidos es esencial y corresponde a lisina y los otros dos, que no
 son esenciales, corresponden a prolina y glicina.
- 10
2. Una vacuna para su uso según la reivindicación 1, en la que el componente activo correspondiente al antígeno
asociado al tumor es CA 15-3, CA 125, CEA, CA 19-9, PSA o fetoproteína alfa.
3. Un método para preparar una vacuna biológica autóloga, que comprende las siguientes etapas:
- 15 a. obtener el antígeno asociado al tumor a partir de la sangre extraída de un paciente con cáncer;
 b. obtener el preparado vacunal del parvovirus atenuado;
 c. introducir 100 a 150 ml de agua destilada y desionizada en un recipiente con un agitador magnético;
 d. centrifugar todos los componentes a una velocidad entre 500 y 2.000 rpm;
20 e. añadir entre 500 y 700 mg de glicina; entre 250 y 500 mg de lisina y 250 a 350 mg de prolina al agua destilada
 que está rotando, uno a uno, o todos a la vez;
 f. añadir 0,2 a 0,3 ml del preparado vacunal viral;
 g. añadir una cantidad entre 0,1 ml y 0,2 ml del antígeno asociado al tumor; y
 h. filtrar y enfriar a -4 °C.
- 25
4. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que la cantidad de agua destilada empleada en la etapa c.
es de 100 ml.
- 30
5. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que la velocidad de centrifugación en la etapa d. es de 500
rpm.

Tabla 1

Distribución de animales experimentales del Ejemplo 1

GRUPO	MACHOS	HEMBRAS	CONTROL MACHOS	CONTROL HEMBRAS	TOTAL
1	5	5	1	1	12
2	5	5	1	1	12
3	5	5	1	1	12
4	5	5	1	1	12
5	5	5	1	1	12
TOTAL	25	25	5	5	60

Tabla 2

Resultados grupo n.º 1

(Dosis: 0,1 ml)

ÓRGANOS ANALIZADOS POR PATOLOGÍA	NÚMERO DE ANIMALES AFECTADOS	
	MACHOS	HEMBRAS
CEREBRO	0	0
MENINGE	0	0
SENTIDOS	0	0
CORAZÓN	0	0
PULMONES	0	0
RIÑONES	0	0
HÍGADO	0	0
PÁNCREAS	0	0
ESTÓMAGO	0	0
INTESTINO	0	0
ÓRGANO SEXUAL	0	0

Tabla 3

Observaciones en otros aspectos para el grupo n.º 1

OTROS ASPECTOS	COMENTARIOS	
	MACHOS	HEMBRAS
PESO	AUMENTO MEDIO EN CADA UNO 30 gramos	AUMENTO MEDIO EN CADA UNO 20 gramos
TAMAÑO	AUMENTO MEDIO EN CADA UNO 1 cm	AUMENTO MEDIO EN CADA UNO 2 cm
PELAJE	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
APETITO	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
VIDA SEXUAL	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
CONSUMO DE AGUA	SE MANTUVO NORMAL 70 ml al día	SE MANTUVO NORMAL 70 ml al día
INFERTILIDAD	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ
MUERTE	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ

Tabla 4

Resultados grupo n.º 2

(Dosis: 0,2 ml)

ÓRGANOS ANALIZADOS POR PATOLOGÍA	NÚMERO DE ANIMALES	
	MACHOS	HEMBRAS
CEREBRO	0	0
MENINGES	0	0
SENTIDOS	0	0
CORAZÓN	0	0
PULMONES	0	0
RIÑONES	0	0
HÍGADO	0	0
PÁNCREAS	0	0
ESTÓMAGO	0	0
INTESTINO	0	0
ÓRGANO SEXUAL	0	0

Tabla 5

Observaciones en otros aspectos para el grupo n.º2

OTROS ASPECTOS	COMENTARIOS	
	MACHOS	HEMBRAS
PESO	AUMENTO DE PESO MEDIO 32 gr CADA UNO	AUMENTO DE PESO MEDIO 22 gr CADA UNO
TAMAÑO	AUMENTO MEDIO 2 CM EN CADA UNO	AUMENTO MEDIO 2 CM EN CADA UNO
PELAJE	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
APETITO	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
VIDA SEXUAL	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
CONSUMO DE AGUA	SE MANTUVO NORMAL 70 ml al día	SE MANTUVO NORMAL 70 ml al día
INFERTILIDAD	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ
MUERTE	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ

Tabla 6

Resultados grupo n.º 3

(Dosis: 0,3 ml)

ÓRGANOS ANALIZADOS POR PATOLOGÍA	RESULTADOS	
	MACHOS	HEMBRAS
CEREBRO	0	0
MENINGES	0	0
SENTIDOS	0	0
CORAZÓN	0	0
PULMONES	0	0
RIÑONES	0	0
HÍGADO	0	0
PÁNCREAS	0	0
ESTÓMAGO	0	0
INTESTINO	0	0
ÓRGANO SEXUAL	0	0

Tabla 7

Observaciones en otros aspectos para el grupo n.º 3

OTROS ASPECTOS	COMENTARIOS	
	MACHOS	HEMBRAS
PESO	AUMENTO MEDIO EN PESO EN CADA 31 gr	AUMENTO MEDIO EN PESO EN CADA 20 gr
TAMAÑO	AUMENTO TAMAÑO MEDIO EN CADA 1,5 cm	AUMENTO TAMAÑO MEDIO EN CADA 2 cm
PELAJE	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
APETITO	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
VIDA SEXUAL	SE MANTUVO NORMAL	SE MANTUVO NORMAL
CONSUMO DE AGUA	SE MANTUVO NORMAL 70 ml al día	SE MANTUVO NORMAL 70 ml al día
INFERTILIDAD	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ
MUERTE	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ

Tabla 8

Resultados grupo n.º 4

(Dosis: 0,4 ml)

ÓRGANOS ANALIZADOS POR PATOLOGÍA	RESULTADOS	
	MACHOS AFECTADOS	HEMBRAS AFECTADAS
CEREBRO	0	0
MENINGES	0	0
SENTIDOS	0	0
CORAZÓN	0	0
PULMONES	0	0
RIÑONES	0	0
HÍGADO	0	0
PANCREAS	0	0
ESTÓMAGO	0	0
INTESTINO	0	0
TESTÍCULO	3	-
OVARIO	-	1
ÚTERO	-	1
TOTAL	3	2

Tabla 9

Observaciones en otros aspectos para el grupo n.º 4

OTROS ASPECTOS	COMENTARIOS		NÚMERO DE	
	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS
PESO	SIN AUMENTO	SIN AUMENTO	0	0
TAMAÑO	SIN AUMENTO	SIN AUMENTO	0	0
PELAJE	NORMAL	NORMAL	0	0
APETITO	REDUCIDO EN 15 %	REDUCIDO EN 15 %	0	0
VIDA SEXUAL	REDUCIDO EN 85 %	REDUCIDO EN 85 %	0	0
AGUA	REDUCIDO EN 20 %	REDUCIDO EN 20	0	0
ESTERILIDAD	SE OBSERVÓ	SE OBSERVÓ	2	3
MUERTE	NO SE OBSERVÓ	NO SE OBSERVÓ	0	0
TERATOGENESIS		NO SE OBSERVÓ	0	0

PORCENTAJE DE MACHOS AFECTADOS

El valor de referencia del 100 % es de 5 animales experimentales

Tabla 10

ASPECTO	ANTES	DESPUÉS
APETITO	100 %	85 %
VIDA SEXUAL	100 %	15 %
AGUA TOMADA	100 %	72 %
AFLICCIÓN		%
TESTÍCULOS		60 %
ESTERILIDAD		40 %

PORCENTAJE DE HEMBRAS AFECTADAS

El valor de referencia del 100 % es de cinco animales experimentales

Tabla 11

ASPECTO	ANTES	DESPUÉS
APETITO	100 %	85%
VIDA SEXUAL	100 %	15%
AGUA	100 %	72%
AFLICCIÓN		%
ÓVARIO		20 %
ÚTERO		20%
FERTILIDAD		60%

Tabla 12

Resultados grupo n.º 5
(dosis 0,5 ml)

ÓRGANOS ANALIZADOS POR PATOLOGÍA	RESULTADOS	
	MACHOS AFECTADOS	HEMBRAS AFECTADAS
CEREBRO	0	0
MENINGES	0	0
SENTIDOS	0	0
CORAZÓN	0	0
PULMONES	0	0
RIÑONES	0	0
HÍGADO	0	0
PÁNCREAS	0	0
ESTÓMAGO	0	0
INTESTINO	0	0
TESTÍCULOS	3	0
OVARIO	0	2
ÚTERO	0	1
TOTAL	3	3

Tabla 13

GRUPO 1: Experimental	GRUPO 2: Experimental	GRUPO 3: Control
2 MACHOS	2 MACHOS	2 MACHOS
2 HEMBRAS	2 HEMBRAS	2 HEMBRAS

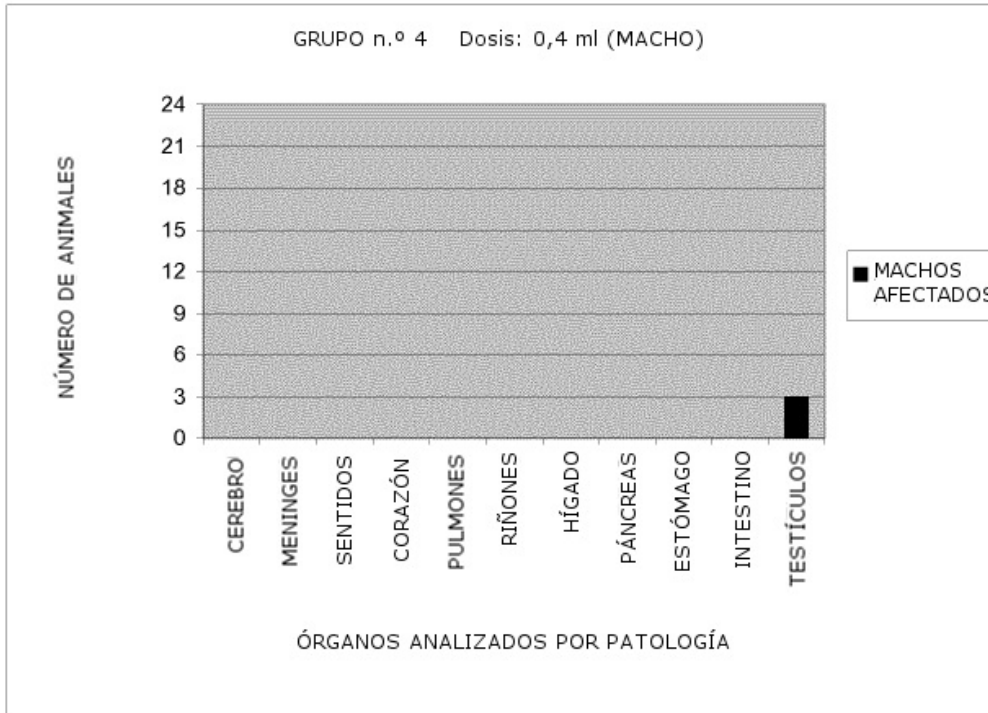
Tabla 14

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Leucemia: 0,2 ml x 3 dosis	Leucemia: 0,2 ml x 3 dosis	Leucemia: 0,2 ml x 3 dosis
Linfoma: 0,2 ml x 3 dosis	Linfoma: 0,2 ml x 3 dosis	Linfoma: 0,2 ml x 3 dosis
Carcinoma de útero: 0,2 ml x 3 dosis	Carcinoma de útero: 0,2 ml x 3 dosis	Carcinoma de útero: 0,2 ml x 3 dosis

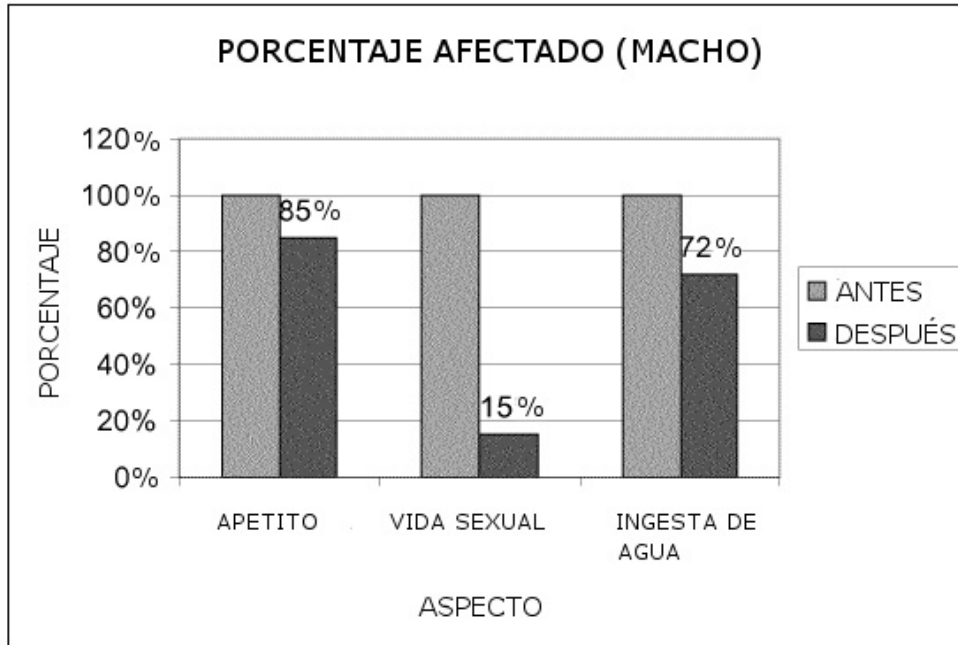
Tabla 15

Fecha	HCT	HGB	PML	Linf	PT	Leuc
10 de mayo de 2005	31,4	10,7	31	98,7	169	1,200
31 de mayo de 2005	33	11,3	47	46	152	1,200
7 de abril de 2004	25,2	8,7	40	56	125	1,200
14 de marzo de 0	32,5	10,7	81,7	6,9	217	4,800
12 de marzo de 2007	44,4	15,2	60,1	1,6	176	5,900
1 de agosto de 2007	45,3	15,5	60,4	30,3	208	6,200
20 de noviembre de 2007	45,6	15,1	69,6	21,4	223	7,300
3 de marzo de 2008	43,4	14,8	69,4	21,6	196	7,500
29 de abril de 2008	43	14,2	69,4	21,2	195	6,700
9 de julio de 2008	44,4	14,3	66	28	209	5,620
10 de marzo de 2009	47,7	16,1	62,9	25,6	223	5,810
11 de agosto de 2009	45,6	15,1	6,6	31,9	209	6,400

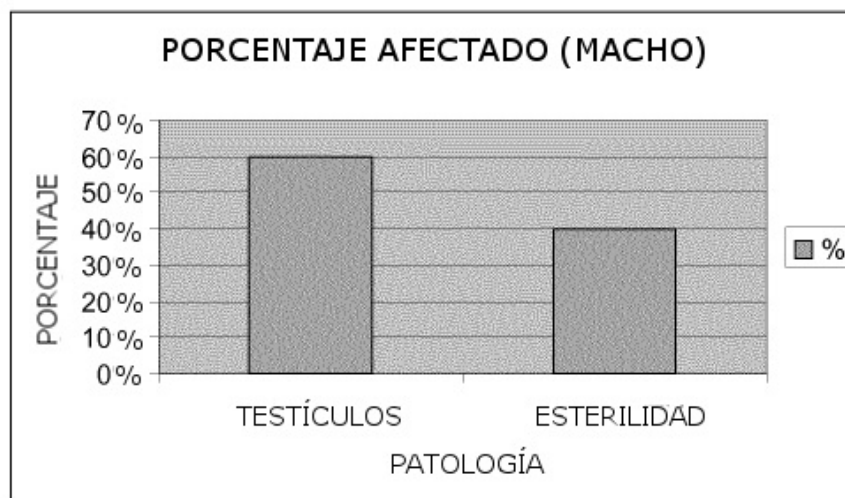
GRÁFICA 1



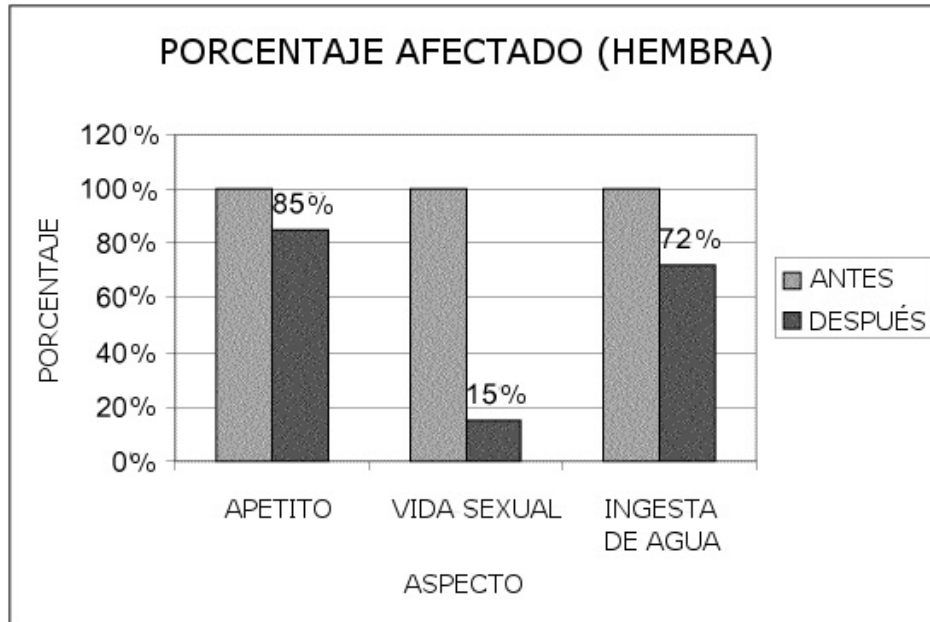
GRÁFICA 2



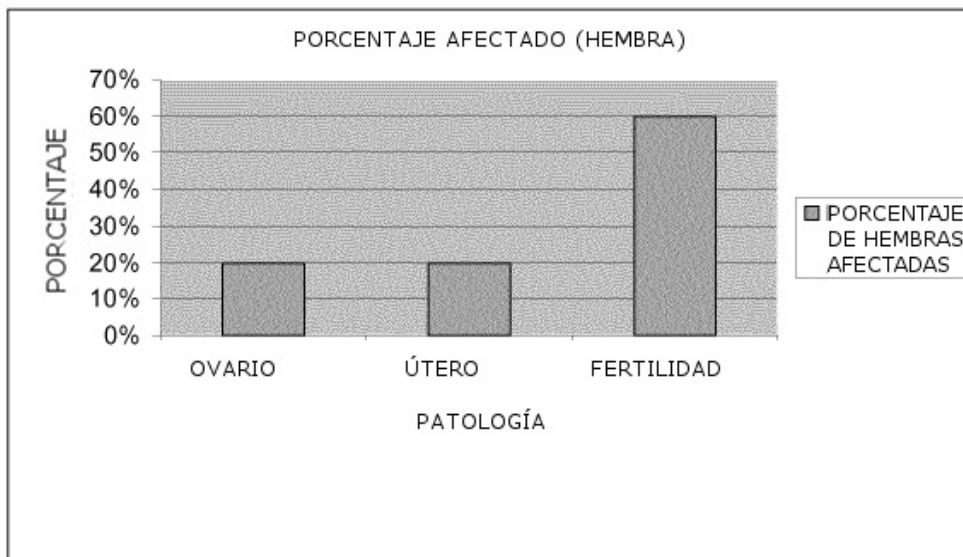
GRÁFICA 3



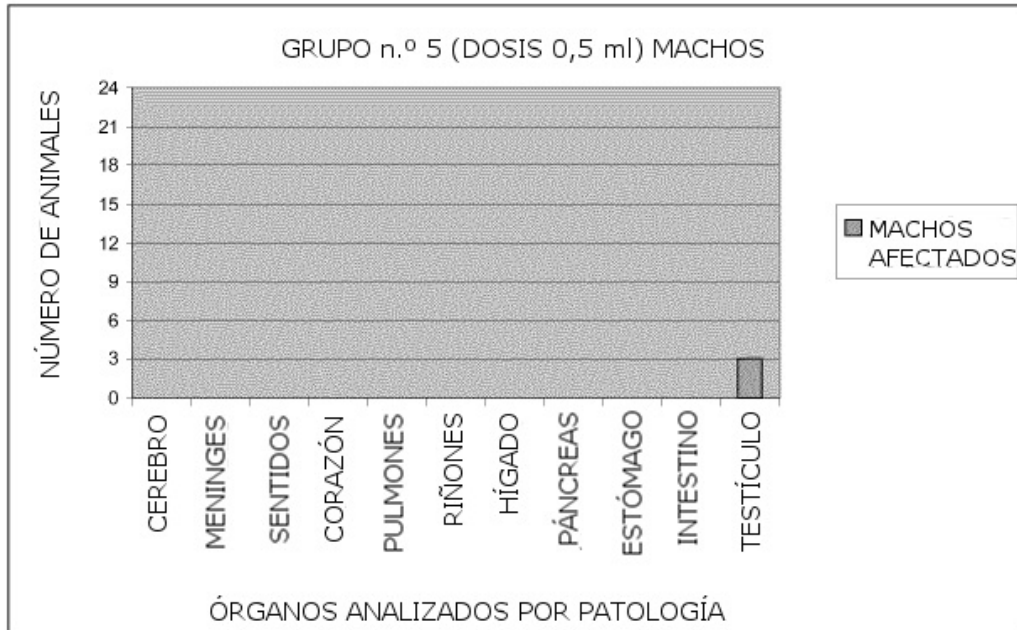
GRÁFICA 4



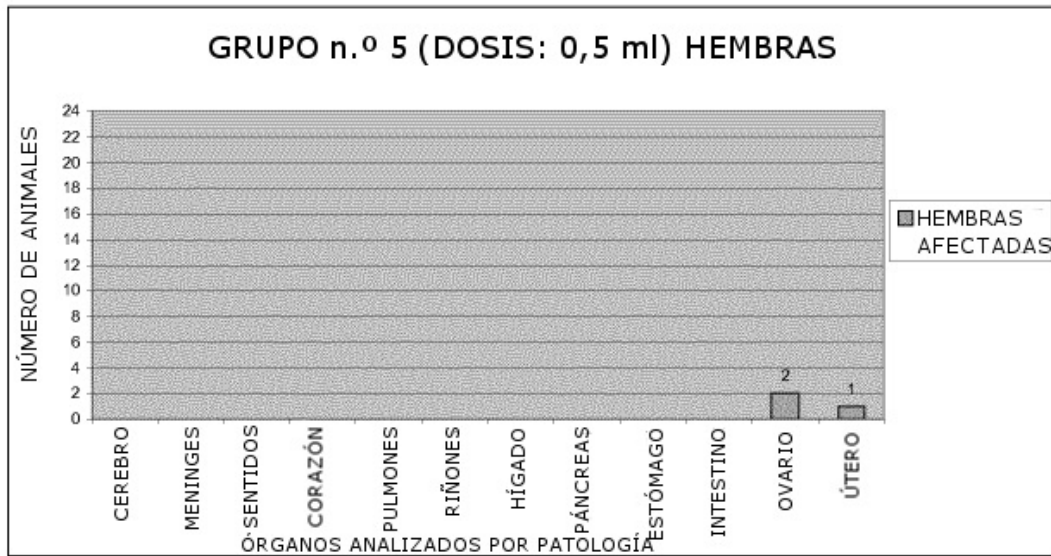
GRÁFICA 5



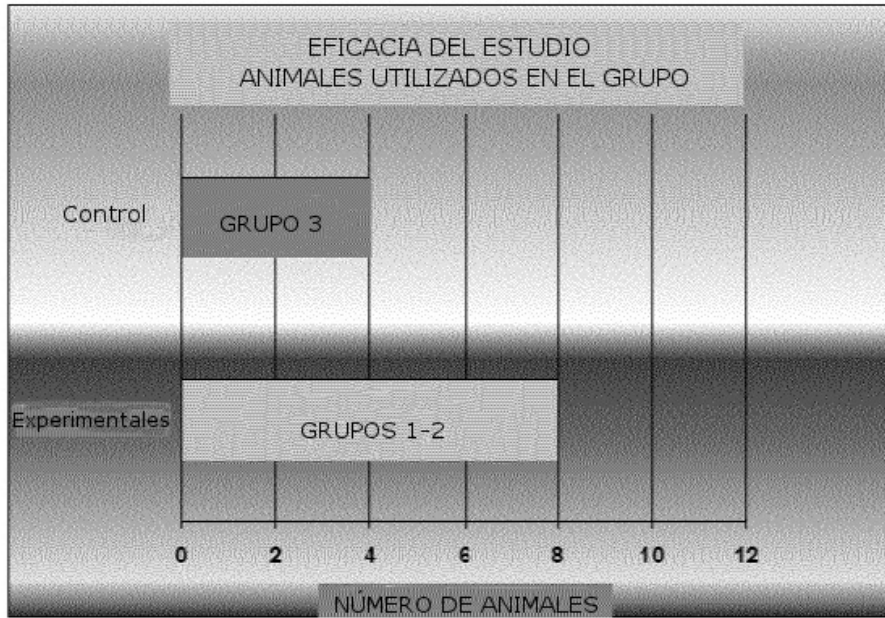
GRÁFICA 6



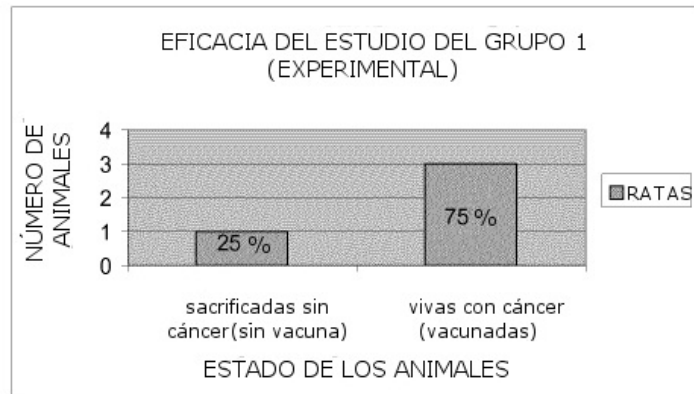
GRÁFICA 7



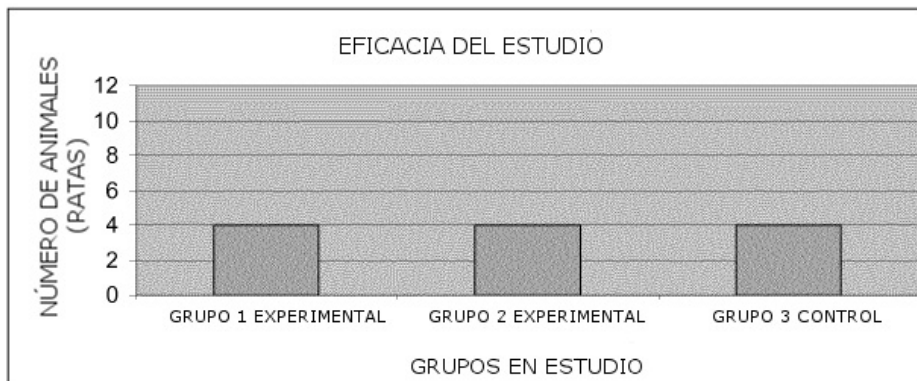
GRÁFICA 8



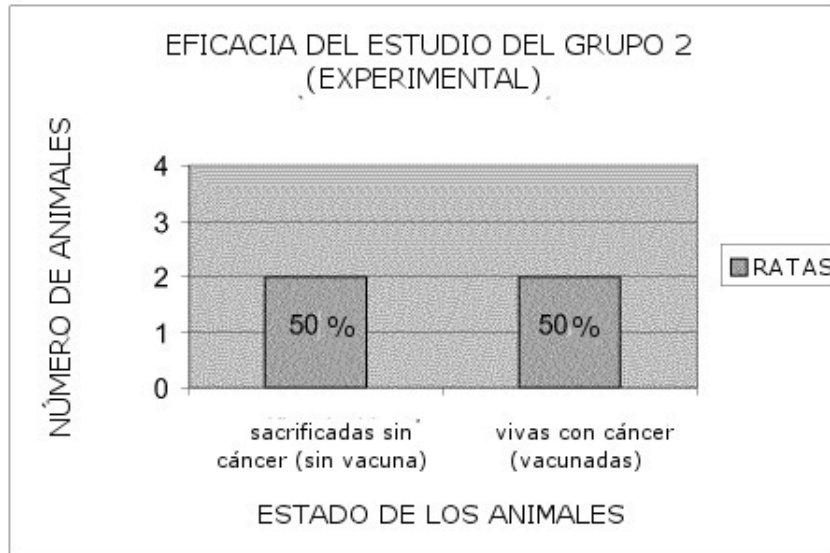
GRÁFICA 9



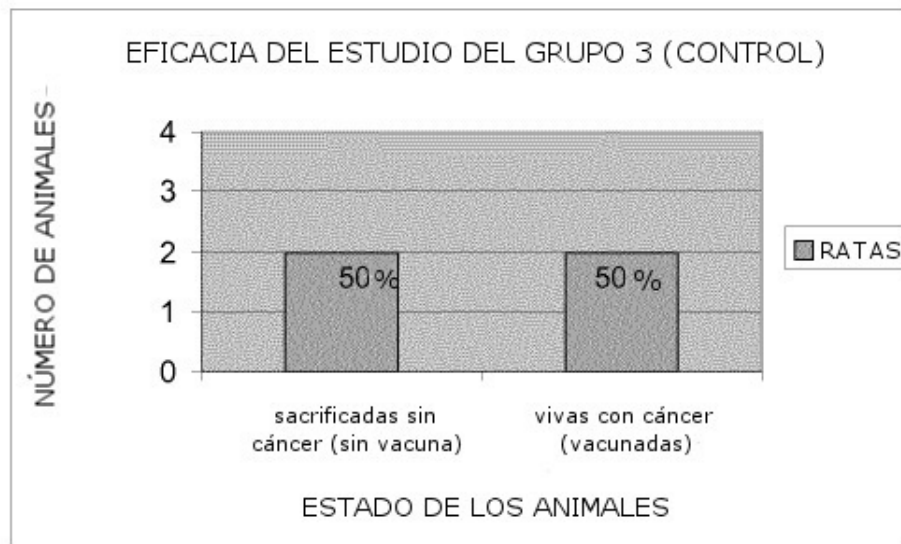
GRÁFICA 10



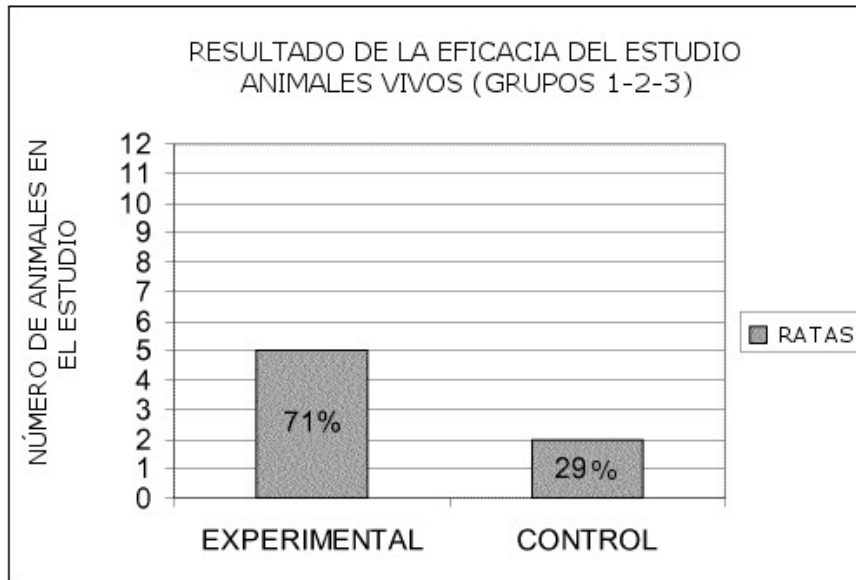
GRÁFICA 11



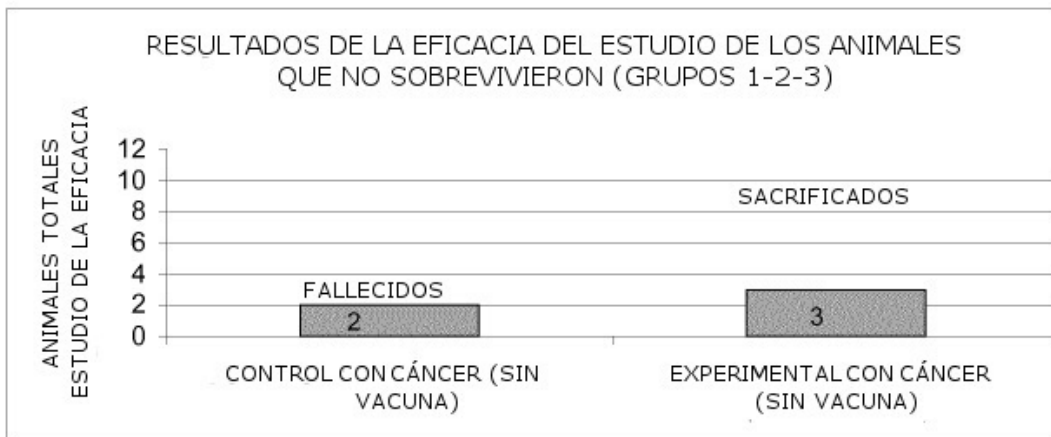
GRÁFICA 12



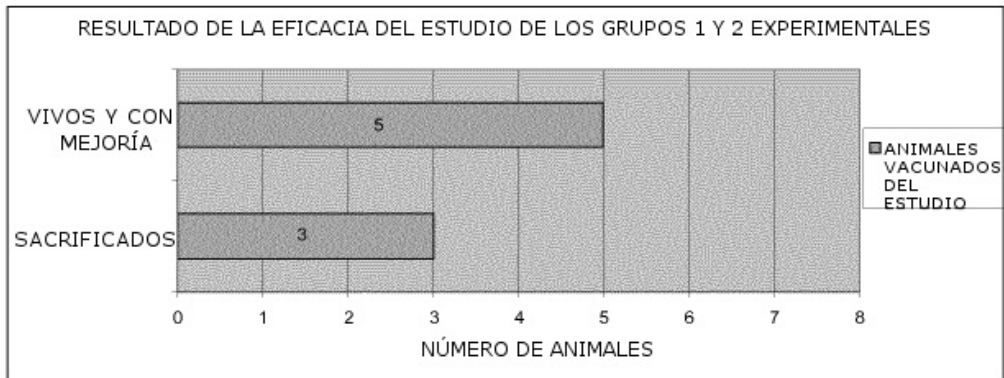
GRÁFICA 13



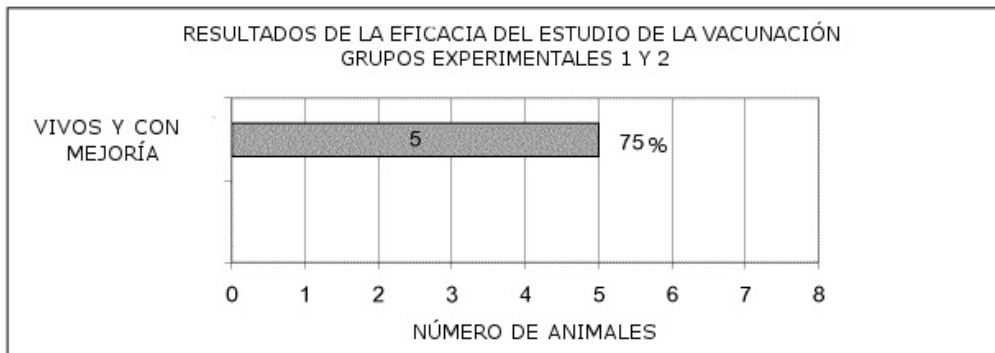
GRÁFICA 14



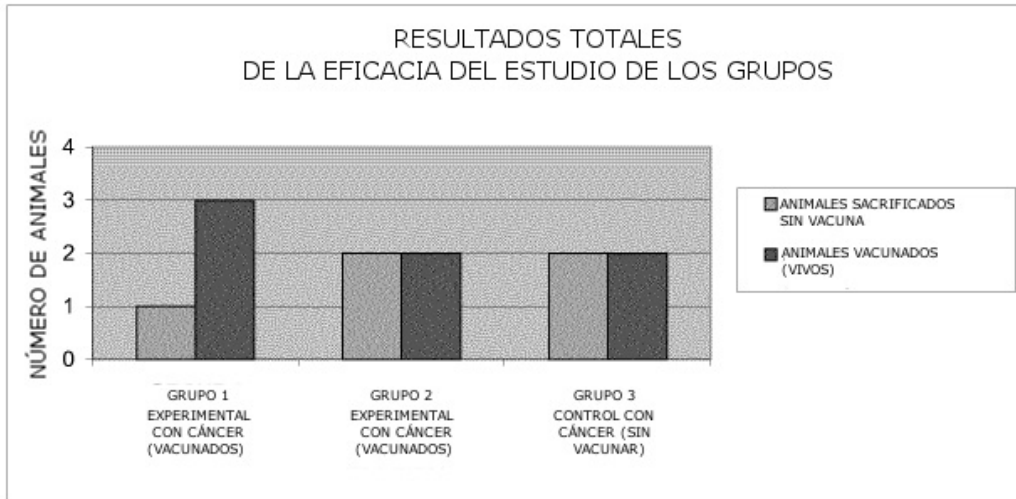
GRÁFICA 15



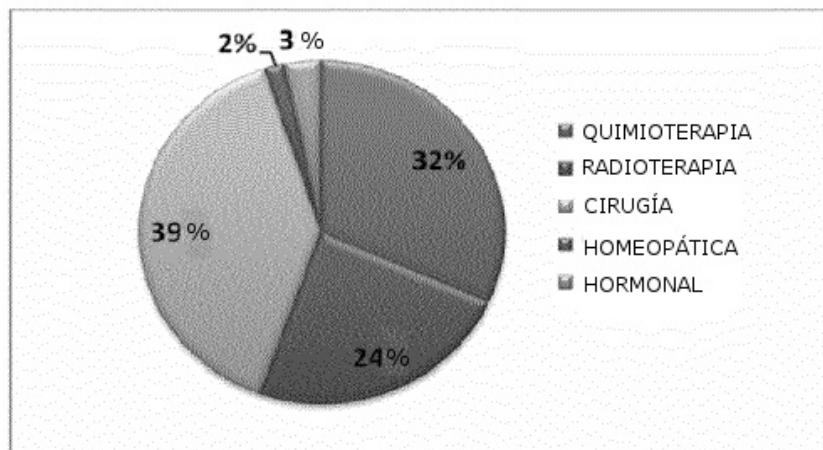
GRÁFICA 16



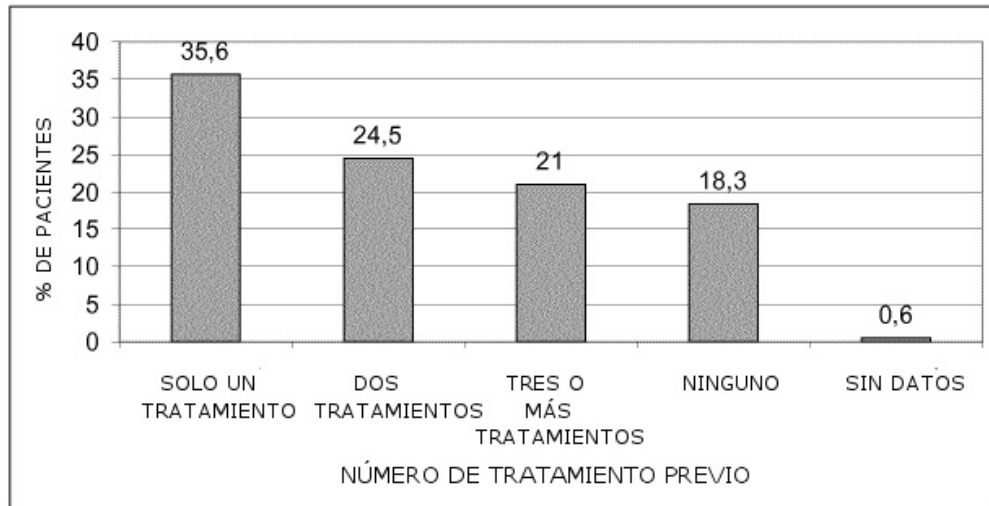
GRÁFICA 17



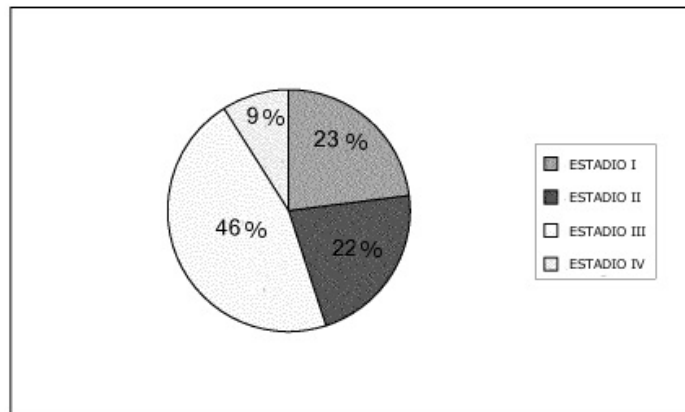
GRÁFICA 18



GRÁFICA 19

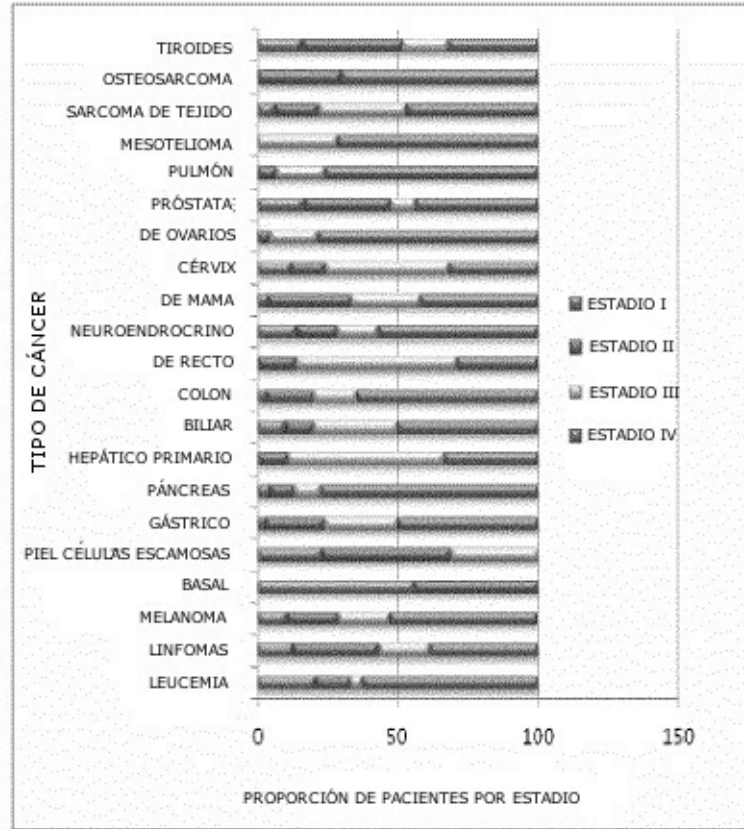


GRÁFICA 20

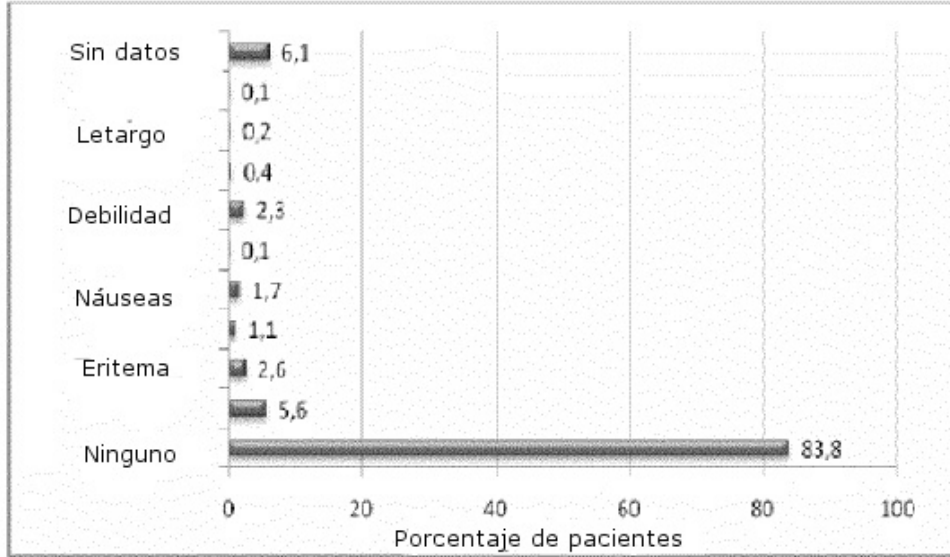


GRÁFICA 21

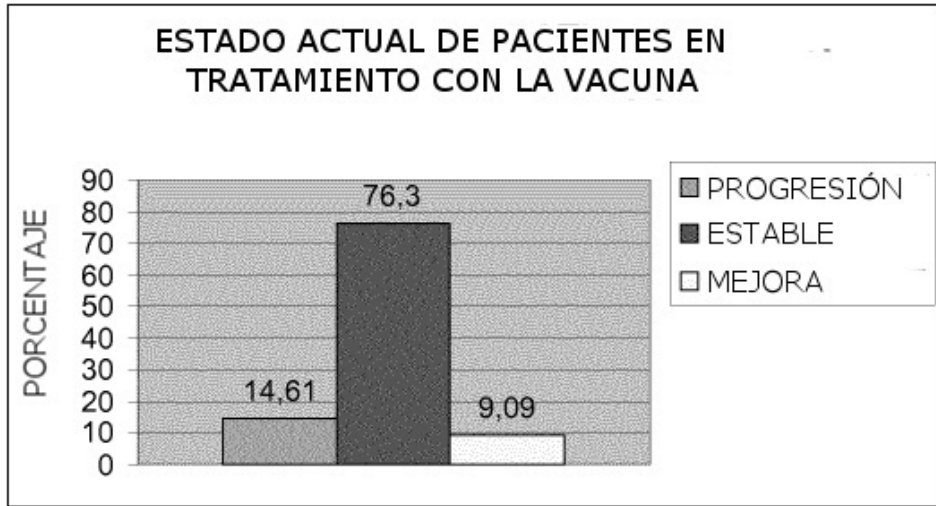
GRÁFICA 21



Gráfica 22

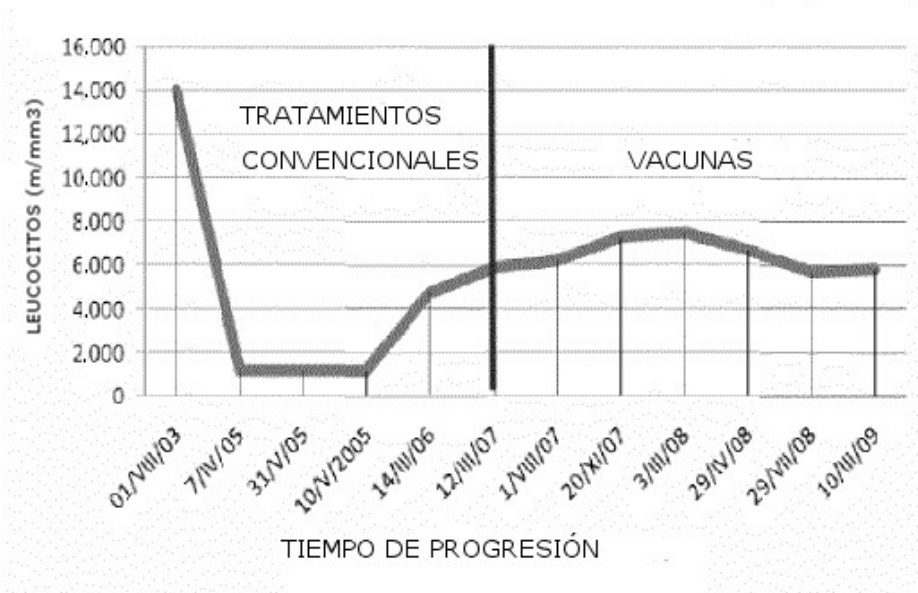


GRÁFICA 23

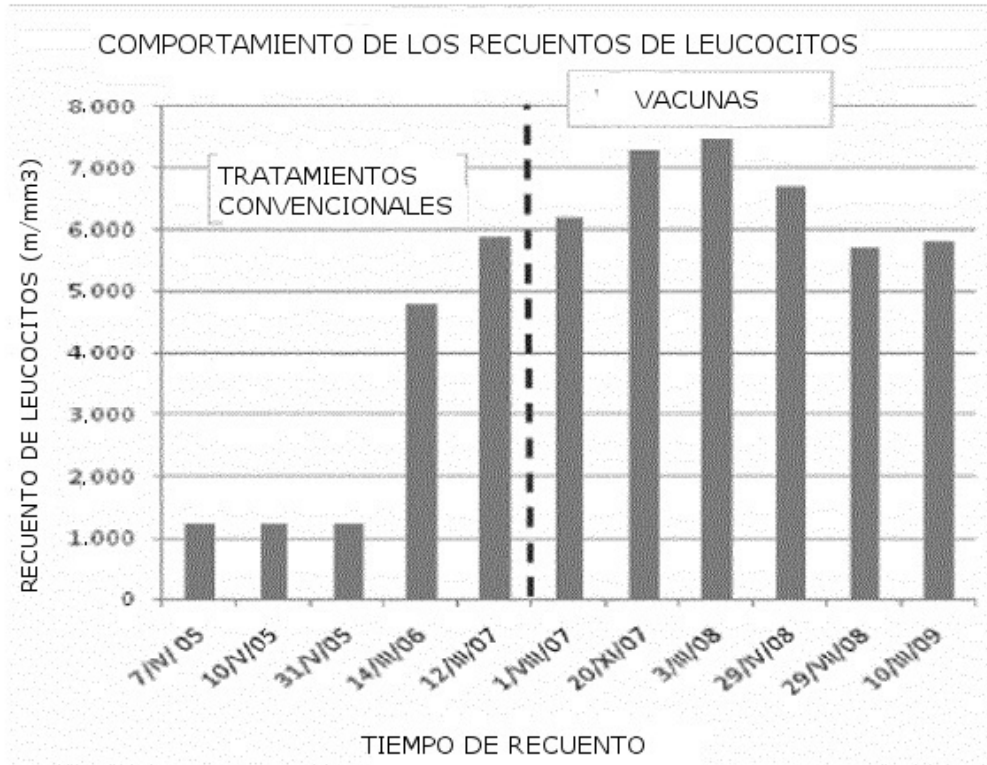


GRÁFICA 24

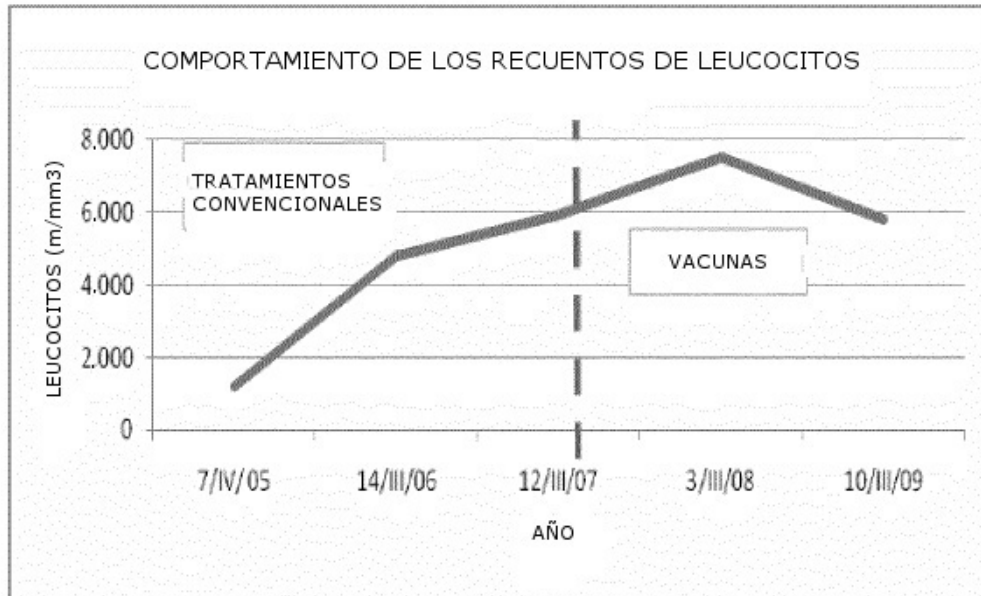
GRÁFICA DE RECuentOS DE LEUCOCITOS (m/mm³)



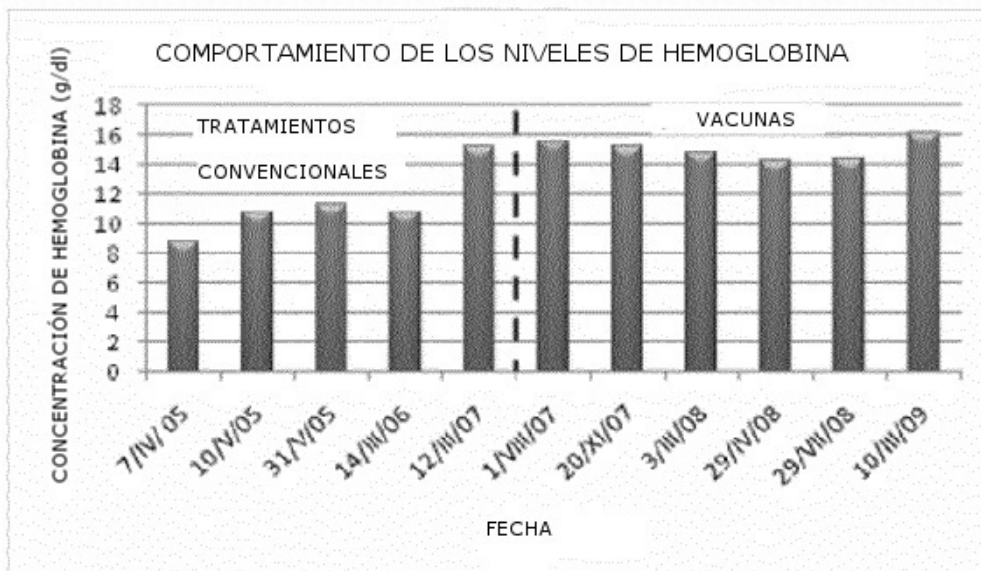
GRÁFICA 25



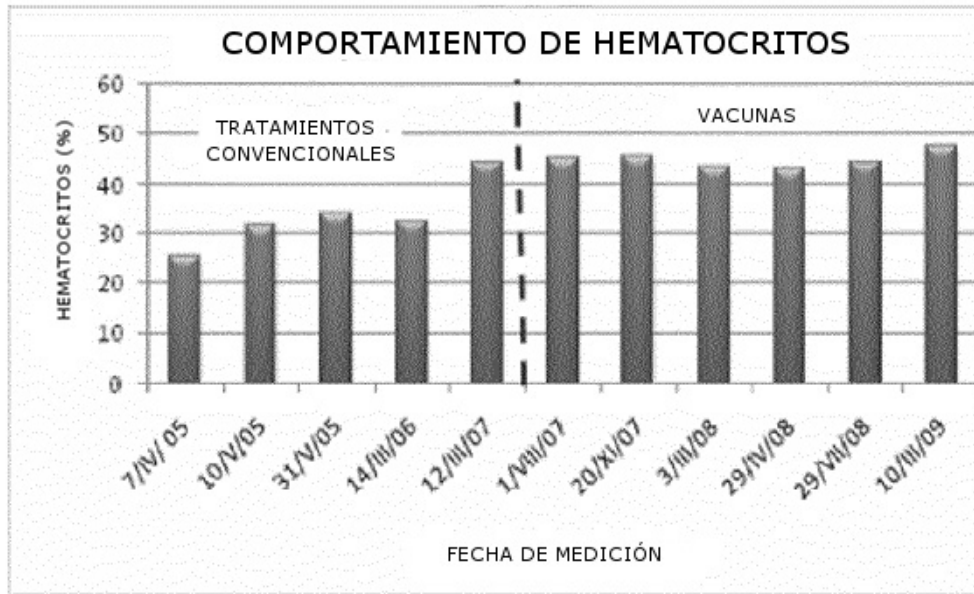
GRÁFICA 26



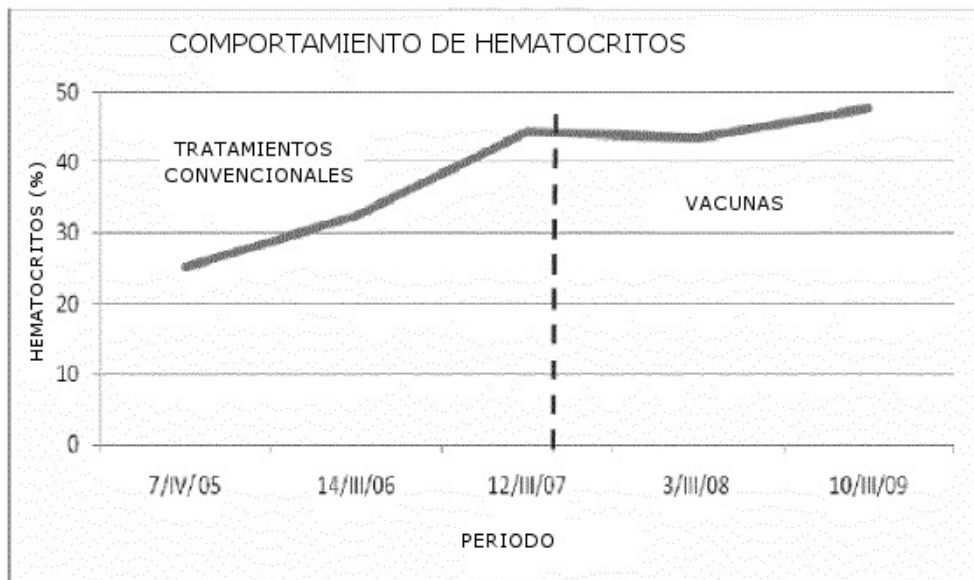
GRÁFICA 27



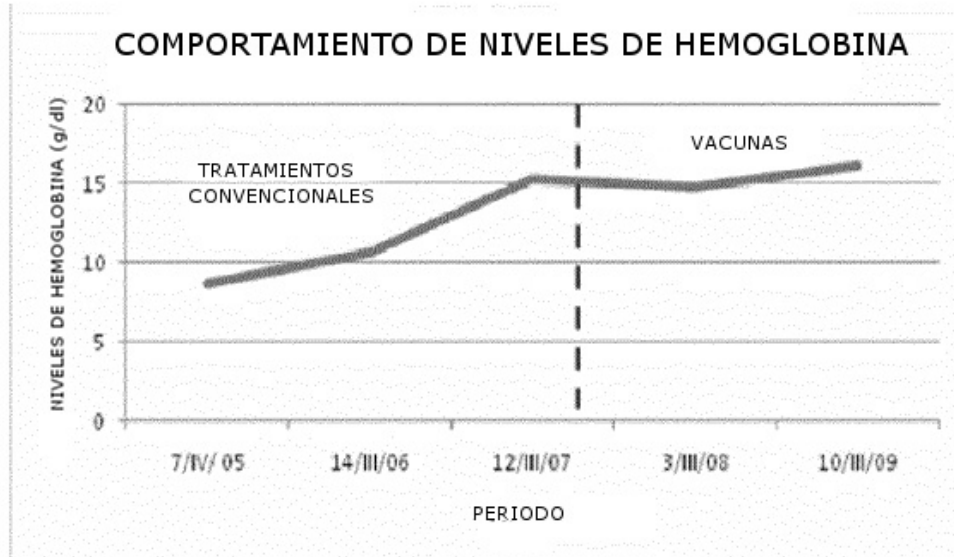
GRÁFICA 28



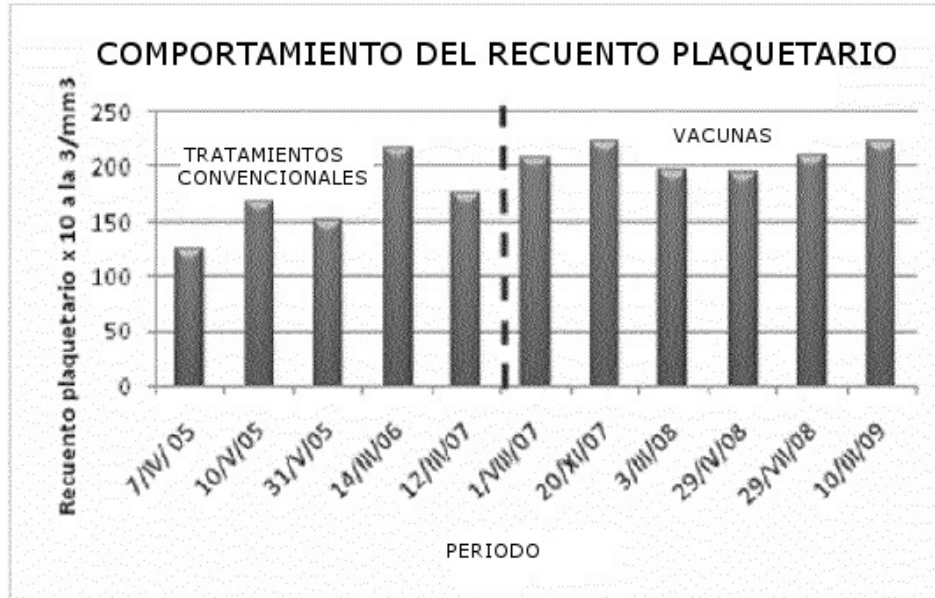
GRÁFICA 29



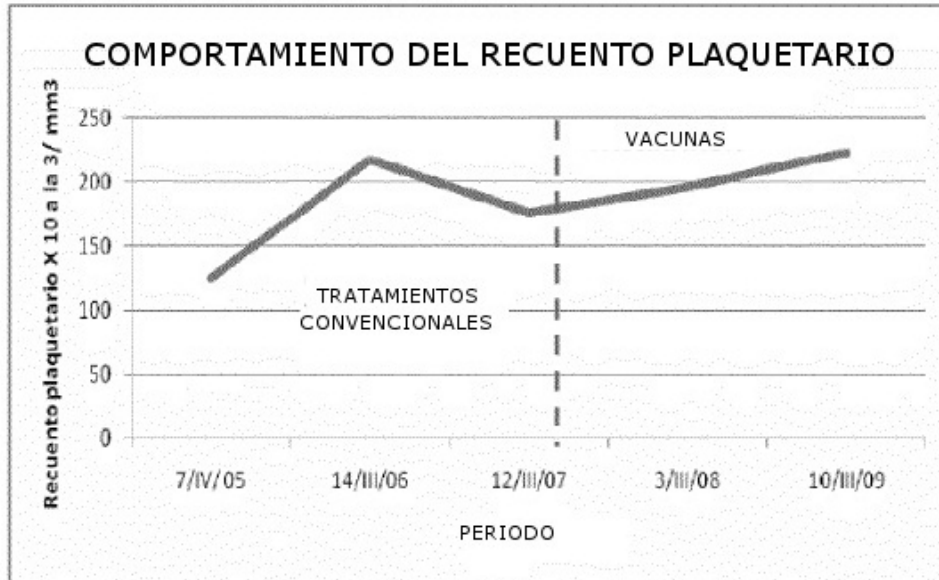
GRÁFICA 30



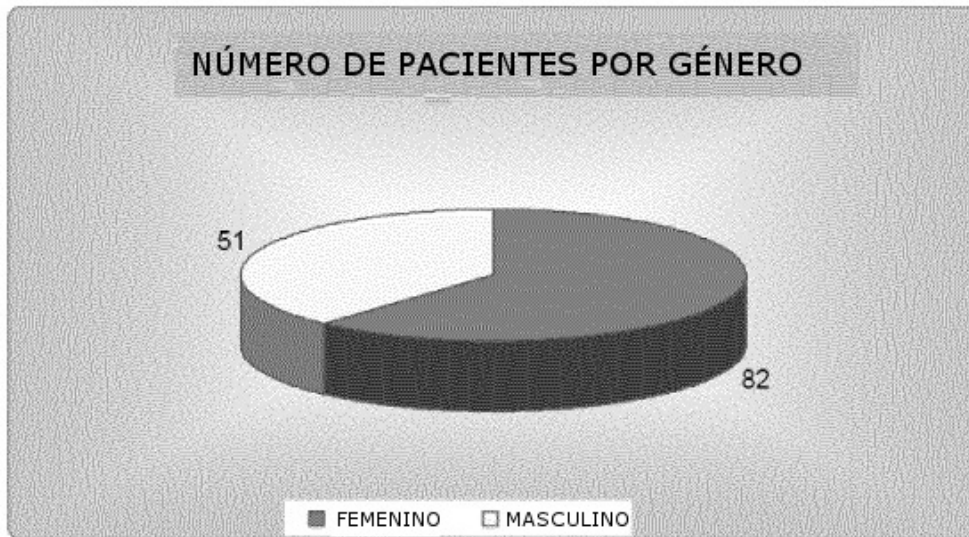
GRÁFICA 31



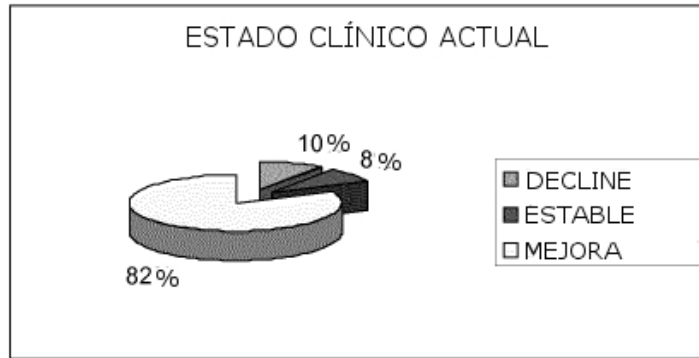
GRÁFICA 32



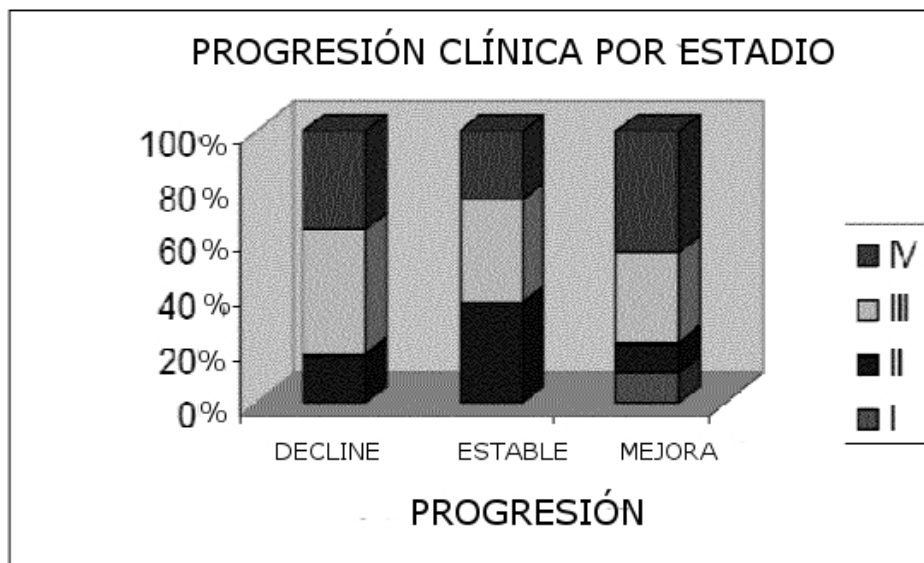
GRÁFICA 33



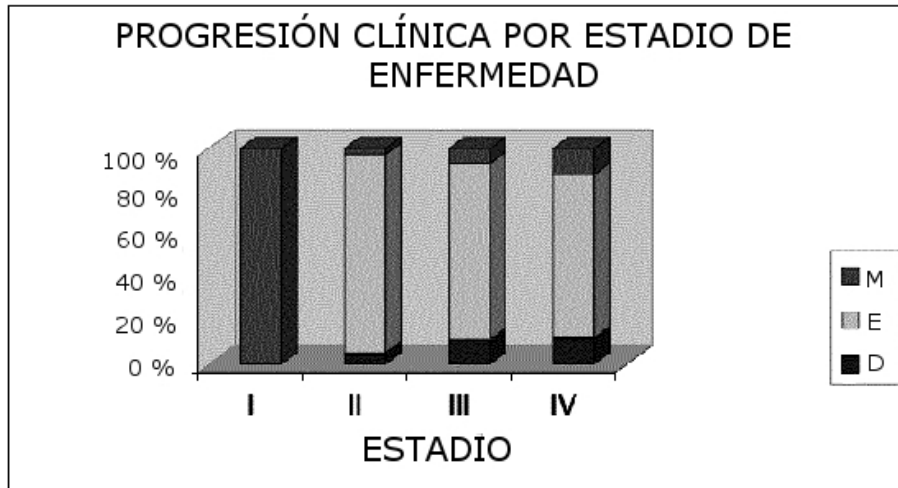
GRÁFICA 34



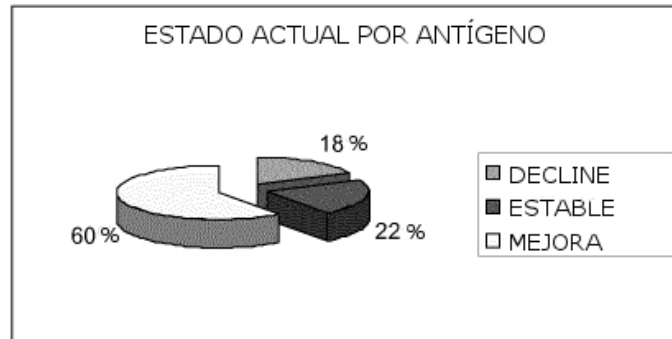
GRÁFICA 35



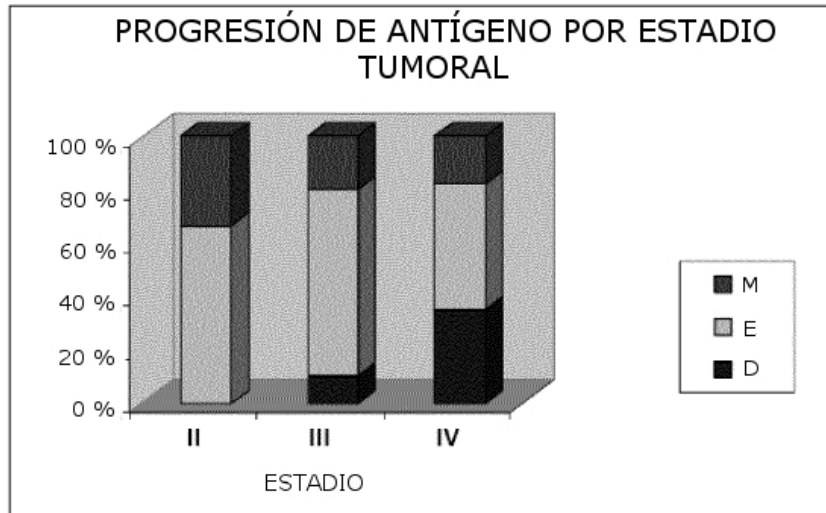
GRÁFICA 36



GRÁFICA 37

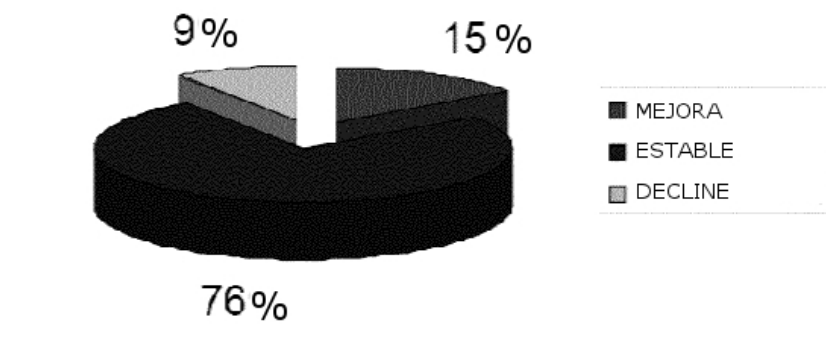


GRÁFICA 38

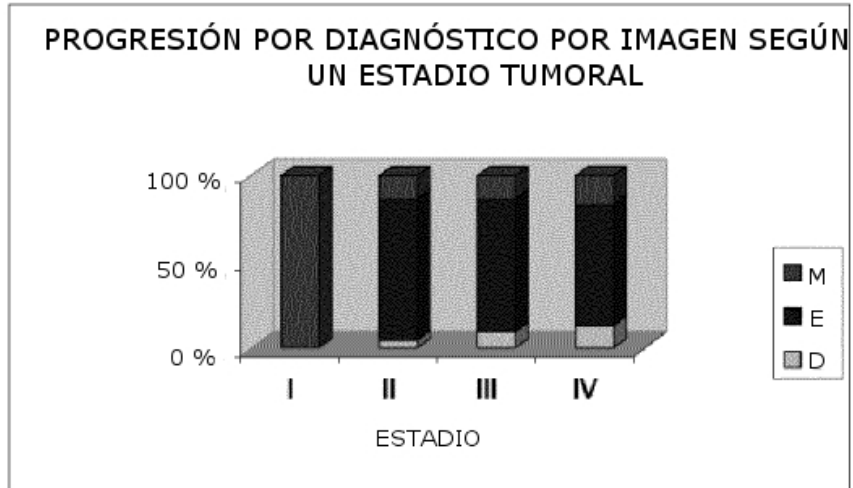


GRÁFICA 39

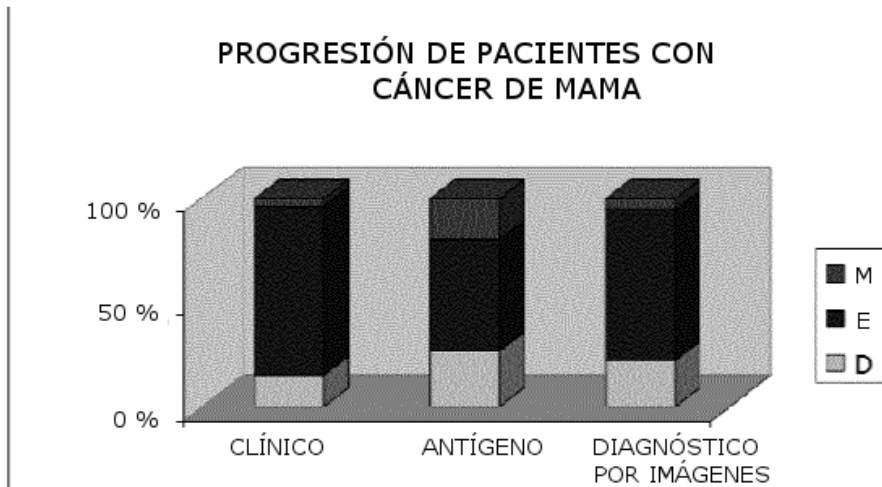
ESTADO ACTUAL POR DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES



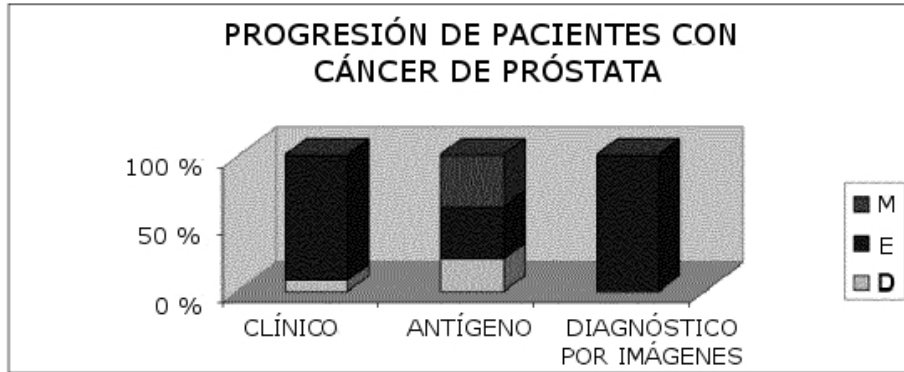
GRÁFICA 40



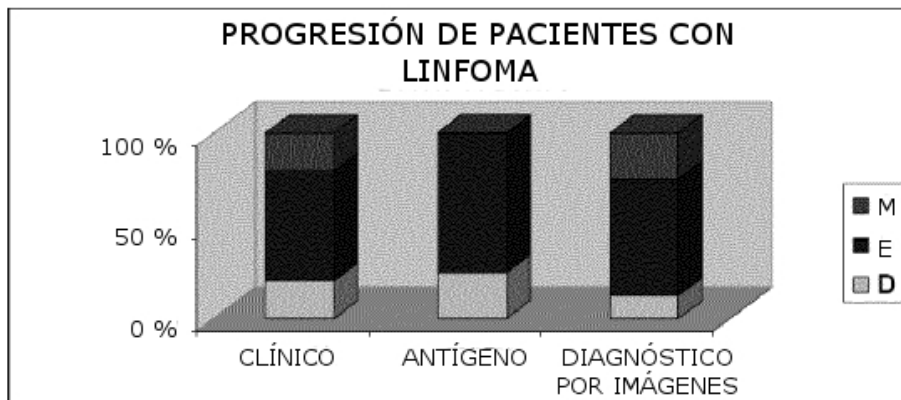
GRÁFICA 41



GRÁFICA 42



GRÁFICA 43



GRÁFICA 44

