

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 949**

51 Int. Cl.:

A01N 31/04 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/065 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2011 PCT/US2011/023090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO2012094030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2011 E 11854601 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2661173**

54 Título: **Régimen anticanceroso**

30 Prioridad:

05.01.2011 US 984843

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

29.05.2017

73 Titular/es:

**ECONUGENICS, INC. (100.0%)
396 Tesconi Court
Santa Rosa, CA 95401, US**

72 Inventor/es:

ELIAZ, ISAAC

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 613 949 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

Régimen anticanceroso

5 **Antecedentes de la invención****Datos de prioridad**

10 Esta solicitud reclama el derecho de prioridad para la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 12/984.843 presentada el 5 de enero de 2011.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a regímenes y terapias destinados a inhibir la formación, evolución y conversión metastásica de una diversidad de cánceres en mamíferos, incluyendo seres humanos. Los cánceres que son objetivo del presente régimen de forma eficaz incluyen tumores sólidos de una amplia diversidad e incluyen tumores primarios, así como cánceres secundarios, tales como un cáncer de próstata que metastatiza a cáncer de hueso. Las dianas de cáncer específicas incluyen cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de pulmón, cáncer nasofaríngeo, cáncer de tiroides, 20 cáncer de ovario, cáncer de útero, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, melanoma, sarcoma, cáncer de ovario, de útero, nasofaríngeo, cerebral, de tiroides o de riñón. Aunque los inventores no han tenido aún la oportunidad de probar este régimen frente a todos los tipos de cáncer, no parece restringido en su aplicabilidad a ningún tipo o línea de cáncer dado, dado que las moléculas de galectina-3 están presentes en una gran diversidad de tumores y los efectos moleculares sinérgicos no son específicos de tumor. La invención también es eficaz frente a tumores no 25 sólidos tales como leucemias y linfomas.

El régimen proporcionado depende de una sinergia observada entre dos agentes anticancerosos documentados, honokiol (obtenido inicialmente a partir de la planta de magnolia) y la pectina cítrica modificada, pectina cítrica que se ha fragmentado ya sea a través de calor, hidrólisis o degradación enzimática, a grupos funcionales de ácido galacturónico esterificados de forma parcial y de un peso molecular menor. En lugar de la PCM, la cual está ampliamente disponible a partir del cedente de la presente solicitud, EcoNugenics Inc. de Santa Rosa, California, como pectina cítrica modificada o PCM Pecta-Sol® y C PectaSol®, pueden emplearse alginatos modificados de forma similar.

35 **Antecedentes de la invención**

La PCM y Honokiol son agentes bien conocidos no tóxicos y bien tolerados eficaces en una diversidad de tratamientos. Honokiol se ha utilizado durante muchos años en los anales de la terapia herbal china y ha demostrado ser eficaz en la inhibición de la agregación plaquetaria, en la protección del miocardio frente al daño isquémico y 40 presenta propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antioxidantes. Hahm *et al.*, Clin. Cancer Res. 14(4) (2008). También se ha demostrado que Honokiol es un agente anticanceroso eficaz. Ha demostrado inducir la apoptosis en células de cáncer de pulmón, Yeng *et al.*, Biochem. Pharmacol. 63: 1641 - 51 (2002), probablemente a través de la activación de la caspasa, y ha demostrado ser eficaz *in vivo* frente al cáncer colorrectal y al cáncer de mama en ratones desnudos que portan tumores trasplantados. Wang *et al.*, World J. Gastroenterol. 10: 3459 - 63 (2004).

45 Independientemente de las explicaciones mecanísticas, Honokiol ha demostrado inhibir la formación de células cancerosas, inhibir la evolución de células cancerosas y dirigirse a células cancerosas para la destrucción a través de apoptosis, e inhibir la metástasis espontánea de células cancerosas establecidas. Esto se ha demostrado *in vitro* frente a líneas de células de cáncer e *in vivo* en mamíferos, incluyendo roedores y seres humanos. Hay que destacar que se ha demostrado, de forma reiterada, que los promisorios efectos frente a líneas celulares se repiten en el análisis *in vivo*. Shigemura *et al.*, Cancer: 109(7) 1279-89 (2007) y Bai, *et al.*, J. Biol. Chem.: 278, 35501-7, (2003) y Ahn *et al.*, Mol. Cancer Res.: 4(9) 621-32 (2006). Honokiol está ampliamente disponible y puede obtenerse de Herbal Extracts Plus de Croyden, Pa, y de Century Supplements de Vancouver, Columbia Británica, así como de un gran número de proveedores de complementos herbales. Es no tóxico y bien tolerado, y tiene eficacia, en 50 diversas indicaciones, a valores de 2-500 mg/kg/día, con valores óptimos para aplicaciones anticancerosas en el intervalo de 25-150 mg/kg/día.

Liu *et al.*, 2008, divulga el efecto antitumoral de Honokiol solo y en combinación con otros agentes anticancerosos en el cáncer de mama.

60 La pectina cítrica modificada (PCM) y sus correspondientes derivados alginato, polisacáridos que tienen un peso molecular menor que 40.000 daltons, están bien establecidos como agentes terapéuticos. La patente de Estados Unidos 7.026.302, así como las patentes de Estados Unidos n.º 6.462.029 y 6.274.566 relacionadas describen productos de PCM y alginatos preparados mediante ya sea hidrólisis o digestión enzimática, que muestran ser eficaces en el tratamiento de una amplia diversidad de intoxicaciones y patologías. La patente de Estados Unidos 65 n.º 7.451.871 divulga también el uso de estas pectinas cítricas modificadas y de compuestos relacionados que

tienen un peso molecular suficientemente bajo para absorberse fácilmente, y que tienen grupos funcionales de ácido galacturónico esterificados de forma parcial, como ayuda en el control de la metástasis del cáncer, mediante la unión a los émbolos de cáncer en la circulación sanguínea. La solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 11/485.955 divulga que la PCM puede utilizarse para potenciar la respuesta del sistema inmunitario de los mamíferos.

El efecto antineoplásico de la PCM está bien documentado. Gunning *et al.*, FASEB J., Vo. 23, 415-424 (2009) revisan primero la eficacia demostrada de la PCM frente a una diversidad de cánceres, tanto en términos de inhibición de la evolución como de la metástasis, y establecen que estas pectinas modificadas y alginatos se unen *in vivo* a la proteína galectina-3 de mamífero. La galectina-3 (Gal3) es una proteína implicada en una serie de distintas evoluciones y conversiones metastásicas de células cancerosas y, mediante la unión a esta proteína, puede inhibirse la transformación de las células en células cancerosas y ralentizarse la evolución de los cánceres existentes. Además de la unión a émbolos de cáncer y de la supresión de la metástasis a través de estos procesos, la PCM también puede ser eficaz en la supresión de la conversión a formas metastásicas. Yan y Katz, *Int. Cancer Ther.* 9 (2), 197-203 (2010). Se ha demostrado que la PCM es eficaz en el tratamiento e inhibición del cáncer de próstata, Pienta *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 24, 1854-62 (2002), así como del cáncer de pulmón, el fibrosarcoma y el melanoma. Kay *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 171-175 (1997) así como de otros tumores sólidos, tales como el cáncer de mama, el cáncer de hígado y el cáncer colorrectal. La PCM parece unirse a la Gal3 presente en la superficie de las células de tumores, tanto sólidos como no sólidos, lo que inhibe el desarrollo y transformación de esos tumores. Azemar *et al.*, *Oncology*, 1, 73-80 (2007). El efecto inmunomodulador de la PCM puede deberse a un fenómeno similar, en donde la unión desencadena determinadas liberaciones químicas o inhibe la inflamación, la adhesión celular y la migración celular. *Id.*

El documento WO 96/01640 divulga un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración oral de PCM soluble.

Por consiguiente, los expertos en la materia conocen los dos agentes bien tolerados no tóxicos, honokiol y PCM, ambas sustancias disponibles de forma comercial en elevados niveles de pureza, que son eficaces como agentes anticancerosos. Estas se pueden administrar en una amplia diversidad de protocolos, que incluyen la administración *i.m.* e *i.v.*, y la parenteral, así como la administración subcutánea, y mediante la adsorción a través de las membranas de las mucosas, a ser posible a través de supositorios rectales y vaginales. Tal vez lo más importante es que han demostrado ser eficaces administrados por vía oral y que pueden tomarse a diario en una dosis o en múltiples dosis al día como parte de un régimen alimenticio. Han demostrado ser seguros y eficaces en un amplio intervalo de dosificaciones, mostrándose el honokiol como eficaz por encima de los 10-500 mg/kg/día y la PCM a niveles de 15-700 mg/kg/día (1-50 g/día), con un nivel óptimo para presentar eficacia frente al cáncer en aproximadamente 75-300 mg/kg/día (5-20 g/día.)

Ninguno de estos agentes es completamente eficaz por sí mismo frente a cánceres particularmente resistentes al tratamiento, tales como las células cancerosas de hígado o colorrectales. Honokiol se ha administrado con bajas dosis de docetaxel (para evitar efectos sistémicos). La combinación proporcionó, hasta un grado limitado, un efecto aditivo que mejora la eficacia sobre la administración de honokiol solo, pero no una mejora sustancial sobre la administración quimioterapéutica convencional. Shigemura *et al.*, pág. 1280. Como se ha indicado en la técnica, es raro obtener efectos aditivos uniformes para la administración de dos agentes dirigidos frente al mismo tipo de cáncer o cánceres. Normalmente, sólo se observa el impacto del más eficaz de los fármacos, con poca mejora obtenida cuando se administran ambos fármacos a niveles terapéuticos eficaces. Lo que con frecuencia se desea, pero raramente se observa, es una combinación sinérgica de dos agentes administrados frente a una diana o enfermedad común. Por definición, tal sinergia es impredecible. Los expertos en la materia continúan buscando tal combinación para combatir la transformación de células en células cancerosas, la evolución de estos cánceres y la transformación de esos cánceres a cánceres metastásicos.

Sumario

Es un descubrimiento del solicitante que una combinación de honokiol y PCM o pectina de bajo peso molecular similar, u otra fuente de grupos funcionales de ácido galacturónico que se unen Gal3 tales como alginatos de bajo peso molecular u otro poliurónido soluble en agua similar, es eficaz en la inhibición de la evolución de cánceres, incluyendo cánceres resistentes a fármacos o a tratamiento, como el cáncer de próstata metastásico, el cáncer de hígado, el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, entre otros. Aunque tanto el honokiol como la PCM han demostrado, de forma separada, ser agentes antineoplásicos eficaces, cuando se combinan el resultado es más que aditivo, es sinérgico. El efecto inhibitor del régimen combinado de honokiol y PCM parece proporcionar una eficacia profunda en la inhibición el desarrollo, evolución y transformación de cánceres de una amplia diversidad.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un poliurónido que presenta la capacidad de unirse a galectina 3 (Gal3) en la superficie de células cancerosas, para su uso en un método para inhibir el cáncer en un mamífero que necesite el mismo, que comprende administrar una cantidad sinérgica de honokiol (HNK) y dicho poliurónido durante un período de tiempo suficiente para inhibir dicho cáncer, en el que dicho poliurónido es pectina cítrica modificada (PCM).

La presente invención también proporciona honokiol (HNK) para su uso en un método para la inhibición del cáncer en un mamífero que necesite el mismo, que comprende administrar una cantidad sinérgica de dicho HNK y un poliuronido que presente la capacidad de unirse a galectina 3 (Gal3) en la superficie de células cancerosas durante un período de tiempo suficiente para inhibir dicho cáncer, en el que dicho poliuronido es PCM.

La presente invención también proporciona una composición de materia que comprende una cantidad de HNK y una cantidad de PCM en cantidades que, cuando se administran a un mamífero que necesita la misma, proporciona un grado sinérgico de inhibición del cáncer superior a los efectos inhibidores logrados mediante la administración de HNK o PCM solo.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, los cuales se incorporan en el presente documento y constituyen parte de la presente memoria descriptiva, ilustran realizaciones ejemplares de la invención y, junto con la descripción general proporcionada anteriormente y la descripción detallada proporcionada a continuación, sirven para explicar las características de la invención. En las Figuras 1-9, la PCM administrada es pectina cítrica modificada PectaSol-c™ o PCMP disponible de EcoNugenics, Inc.

Las Fig. 1A, B y C reflejan los efectos de la administración de PCM u honokiol (HNK) o su combinación, respectivamente, en células de hígado

La Figura 2 refleja un aumento de la activación de los linfocitos T auxiliares/inductores después de la administración de PCM.

La Figura 3 refleja un aumento de la activación de los linfocitos T citotóxicos/supresores después de la administración de PCM.

La figura 4 muestra el aumento porcentual de la activación de los linfocitos T auxiliares/inductores después de la administración de PCM.

La Figura 5 proporciona el aumento porcentual de la activación de los linfocitos T citotóxicos/supresores después de la administración de PCM.

La Figura 6 refleja el aumento de la activación de los linfocitos B logrado mediante la administración de PCM.

La figura 7 muestra el aumento porcentual de la activación de linfocitos B debido a la administración de PCM, en comparación con los controles positivos (T2CA y PWM).

La Figura 8 refleja el aumento de la activación de linfocitos NK logrado mediante la administración de PCM.

La figura 9 muestra el aumento porcentual de la activación de linfocitos NK debido a la administración de PCM, en comparación con los controles positivos (T2CA y PWM).

Descripción detallada de la invención

La invención del solicitante comienza con el reconocimiento de que la PCM tiene un importante efecto estimulador sobre el sistema inmunitario. Los efectos inmunomoduladores de la PCM podrían estar implicados en la sinergia observada entre estos dos agentes. La sinergia también puede ser dependiente de las propiedades antiinflamatorias de HNK y de la activación de rutas adicionales cuando se coadministran. Como una posible explicación, aunque los solicitantes no desean ligarse a esta teoría, se cree que el efecto inmunomodulador de la PCM permite una mejor presentación de la célula cancerosa, o de la célula cancerosa potencial, que permite que el HNK efectúe mejor la apoptosis y la destrucción de células. Por lo tanto, aunque tanto la PCM como HNK se destacan por su capacidad para inhibir la formación, evolución y transformación de células cancerosas *in vitro* e *in vivo*, su acción parece ser a través de modos distintos. La capacidad de la PCM para unirse a Gal-3 presente en la superficie de las células cancerosas y de potenciar una reacción inmunitaria *in vivo*, se cree que a su vez permite a HNK destruir células cancerosas o inhibir su crecimiento de forma mucho más eficaz. Por lo tanto, su efecto combinado es sinérgico, proporcionando una inhibición del cáncer superior a los resultados obtenidos mediante la administración de cualquiera de los agentes solo.

En la presente solicitud, por cantidad sinérgica se hace referencia al efecto obtenido administrando de forma simultánea cantidades eficaces tanto de PCM como de HNK. Un resultado sinérgico es uno en donde la inhibición del cáncer es mayor que los mismos resultados obtenidos administrando la cantidad idéntica de PCM solo, más la inhibición lograda mediante la administración de la misma cantidad de HNK solo. Los dos parecen sinérgicos sobre sus intervalos convencionales, pero cuando aparece la frase en la presente solicitud de patente, está destinada a significar una cantidad de PCM o HNK suficiente para lograr la sinergia observada como consecuencia de la administración del agente restante en el presente documento. En general, se obtiene un resultado sinérgico cuando se administra HNK en cantidades de aproximadamente 10-500 mg/kg/día con un intervalo preferente que es de 15 mg/kg/día hasta 300 mg/kg/día, y la PCM se administra en el intervalo de 15-700 mg/kg/día (1-50 g/día). Los valores proporcionados anteriormente son para la administración oral. Los expertos en la materia están bien familiarizados con los métodos para la titulación desde esas dosificaciones hasta dosificaciones apropiadas y equivalentes para los modos de administración i.v., i.m., i.p., subcutáneo o de penetración en las mucosas.

El objetivo de la administración de PCM y HNK es la inhibición del cáncer. Inhibición se refiere a la prevención y la ralentización de la formación, crecimiento y transformación de los cánceres tratados mediante el régimen de la

presente invención. En una forma, el régimen es el ingesta diario de PCM y HNK en el intervalo sinérgico. Esto inhibe la formación del cáncer y la evolución de los cánceres que pueden estar localizados o en etapas tempranas, en particular células y estados precancerosos. Por lo tanto, el consumo diario de una cantidad sinérgica de HNK y PCM forma un aspecto importante de la presente invención. Inhibición del cáncer, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a la inhibición o ralentización del crecimiento de cánceres establecidos. Esto es particularmente significativo en la ralentización del crecimiento de tumores sólidos. Por lo tanto, la capacidad de la PCM para unirse a Gal3 o presentar de otra forma células cancerosas para los efectos citotóxicos anticancerosos de HNK, forma un segundo aspecto de la presente invención. Otra vez, es necesaria la administración de una combinación sinérgica de HNK y PCM. En esta segunda realización, los niveles de dosificación pueden ser más elevados que el modelo profiláctico. Para inhibir el crecimiento de cánceres desarrollados, incluso de cánceres avanzados, puede ser apropiado un valor de 8-50 gramos/día (100-700 mg/kg/día) de PCM y de 25-500 mg/kg/día de HNK. Como para la prevención de la formación de cánceres, en este modo de tratamiento terapéutico, el efecto óptimo se observa a través de la administración diaria de PCM y HNK en cantidades sinérgicas. En este aspecto, la administración de HNK y PCM en cantidades sinérgicas puede combinarse con la administración de terapias anticancerosas establecidas tales como doclitaxel y paclitaxel, o doxorubicina, en niveles normales o reducidos, fármacos que han demostrado eficacia frente a determinados cánceres pero que se reconocen ampliamente como tóxicos de forma sistémica a los niveles que pueden necesitarse para la eficacia. HNK y PCM también pueden combinarse con otros agentes terapéuticos tales como productos vegetales, minerales y vitaminas, siendo un ejemplo la quercetina, la curcumina, extracto de té verde de forma HCGC, la artemisinina, el fenilbutirato de sodio, el resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno), la vitamina D-3 y otros. De forma similar, para reducir las dosificaciones necesarias para estas inmunoterapias y productos biológicos, o para mejorar la eficacia a las dosificaciones establecidas, pueden administrarse junto con la combinación sinérgica de HNK y PCM, inmunoterapia y productos biológicos establecidos, tales como anticuerpos dirigidos al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), al factor de crecimiento endotelial (EGFR), y otros anticuerpos dirigidos de eficacia demostrada frente al cáncer, como trastuzumab (Herceptin®) y bevacizumab (Avastin®). La administración de HNK y PCM en cantidades sinérgicas proporciona una base para la administración de agentes tóxicos a una cantidad inferior, subtóxica, para lograr un tratamiento del cáncer potenciado. Por el contrario, la administración de un agente quimioterapéutico en su dosificación normal eficaz, combinada con una cantidad sinérgica de PCM o HNK, puede de hecho utilizarse para reforzar la eficacia del agente quimioterapéutico administrado solo.

Como saben bien los expertos en la materia, para muchos cánceres la mortalidad está vinculada con la transformación del cáncer primario en un cáncer metastásico, dando origen a una diversidad de metástasis secundarias, que incluyen cánceres elevadamente resistentes al tratamiento, como el cáncer de hueso o de hígado. En una tercera realización de la presente invención, la inhibición del cáncer se mide en la inhibición y ralentización de la transformación de un cáncer primario a cáncer metastásico, y la inhibición de la propagación y formación de metástasis. En muchos casos, la inhibición prolongada de la transformación de los cánceres primarios puede proporcionar suficiente tiempo para que las terapias quimioterapéuticas y radiactivas convencionales reduzcan o eliminen de forma eficaz el cáncer primario - terapias que fallarían ante la transformación. También puede proporcionar remisiones más largas y un tratamiento más eficaz en general en la prevención de procesos metastásicos. La coadministración de PCM y HNK en cantidades sinérgicas puede utilizarse para frenar o retrasar tanto la transformación de un cáncer primario en uno metastásico como para controlar o inhibir la propagación o diseminación de la metástasis.

La PCM presenta estimulación del sistema inmunitario

Un laboratorio independiente realizó los estudios para examinar la activación de las células del sistema inmunitario como consecuencia de la administración de la PCM de EcoNugenics, Inc.

La activación de linfocitos *in vitro* representa una estrategia convencional para evaluar respuestas mediadas por células a una diversidad de estímulos, incluyendo extractos vegetales inmunoestimuladores. El sistema de ensayo FastImmune controla la expresión del marcador de activación temprana CD69 en sangre completa después de la estimulación con extractos. CD69 se expresa en todos los linfocitos activados (linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK) y, por lo tanto, representa un marcador genérico para controlar respuestas de subconjuntos individuales a estímulos específicos.

Los subconjuntos de linfocitos T se pueden identificar y cuantificar utilizando combinaciones de anticuerpo marcados con fluorocromo, tales como CD4/CD69/CD3 y CD8/CD69/CD3. El antígeno CD4 se expresa en el subconjunto de linfocitos T auxiliares/inductores (CD3/CD4). El antígeno CD8 se expresa en el subconjunto de linfocitos T supresores/citotóxicos humanos (CD3/CD8). Una vez activados, tanto los linfocitos T CD4 como los CD8 positivos expresan CD69.

El antígeno CD 19 está presente en linfocitos B humanos en todas las fases de maduración y no está presente en linfocitos T en reposo o activados. La combinación CD19/CD69/CD45 puede utilizarse para identificar la población de linfocitos B activados. El antígeno CD56 está presente en los linfocitos citolíticos naturales (NK) y la intensidad del antígeno aumenta con la activación de los linfocitos NK. Por lo tanto, la combinación CD56/CD69/CD45 puede utilizarse para identificar linfocitos NK activados.

Para empezar, para el ensayo se solubilizó la PCMP en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y dimetilsulfóxido (DMSO). La solubilidad en PBS se determinó como que era mayor que en el DMSO. La solubilidad de la PCMP (n.º de Lot 30324) en PBS fue del -76,4 %. El volumen se ajustó para obtener para el tratamiento cantidades precisas de cada compuesto, a base del factor de solubilidad.

5 Se recogieron muestras de sangre a partir de voluntarios sanos y se incubaron 250 µl de muestra de sangre en placas de 48 pocillos con concentraciones crecientes de compuesto, junto con controles positivos apropiados (recomendados por Becton Dickinson Biosciences, CA) para cada subconjunto. Como controles para los estudios de activación de linfocitos T se utilizaron CD2/CD2R y éster de forbol (PMA). Como control positivo para la activación de linfocitos B se utilizó el mitógeno de *Phytolacca americana* (PWM: siglas del inglés *Phytolacca americana* mitogen) y para la activación de linfocitos NK en cultivos de sangre se utilizó IL-2. También se utilizó como un control T2CA, un complejo de polisacáridos caracterizado, evaluado en estos ensayos. Los cultivos de sangre se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 24 h. El siguiente día, se dispensaron en tubos de flujo separados 20 µl de la mezcla de anticuerpos específica, [CD4-FITC/CD69-PE/CD45-PerCP (activación de linfocitos T auxiliares/inductores), CD8-FITC/CD69-PE/CD3-PerCP (activación de linfocitos T citotóxicos/supresores), CD 19-FITC/CD69-PE/CD45-PerCP (activación de linfocitos B) y CD56-FITC/CD69-PE/CD45-PerCP (activación de linfocitos NK)] y se mezclaron 50 µl de muestra de sangre con anticuerpo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La mezcla sangre-anticuerpo se lisó en una estación de trabajo Coulter Epics Q-prep utilizando el kit Immunoprep y se procesó en un citómetro de flujo Beckman Coulter Elite utilizando un protocolo de 3 colores. Se calculó el porcentaje de los subconjuntos de linfocitos T, de linfocitos B y de linfocitos NK activados, y el aumento porcentual por encima del control no tratado y se representaron frente a las concentraciones de compuesto.

Activación del subconjunto de linfocitos T:

25 Los efectos del compuesto sobre la activación de linfocitos T auxiliares/inductores y T citotóxicos/supresores se muestran en la Tabla 1 y en las Fig. 2 y 3. Los aumentos porcentuales de la activación de los linfocitos T auxiliares/inductores y los T citotóxicos/supresores se muestran en la Tabla 2 y en los respectivos gráficos en las Figs. 4 y 5. Los resultados muestran que la PCMP no tiene un efecto significativo sobre la activación de los linfocitos T auxiliares/inductores en comparación con los controles positivos como CD2/CD2R y PMA. Sin embargo, entre 30 concentraciones de 50-800 µg/ml, PCMP activó a los linfocitos T citotóxicos/supresores a niveles más bajos y de una manera dependiente de la dosis. En este caso, los tres controles positivos indujeron las respuestas esperadas.

Tabla 1: Efecto de la pectina cítrica modificada PectaSol-C (PCMP) sobre la activación de linfocitos T auxiliares/inductores y T citotóxicos/supresores en cultivos de sangre				
Tratamiento	Activación de linfocitos T auxiliares/inductores		Activación de linfocitos T citotóxicos/de supresión	
	Activación (%)	DT	Activación (%)	DT
No tratado	2,70	0,11	3,68	0,19
PCMP-10 µg/ml	2,04	0,66	3,39	0,18
PCMP- 20 µg/ml	2,11	0,56	3,28	0,24
PCMP- 50 µg/ml	2,18	0,25	4,29	0,02
PCMP- 100 µg/ml	2,62	0,54	4,35	0,81
PCMP-200 µg/ml	2,43	0,99	4,75	0,50
PCMP-400 µg/ml	2,37	0,10	7,48	0,80
PCMP-800 µg/ml	2,80	0,13	8,78	0,81
T2CA 50 µg/ml	3,30	0,29	7,60	0,69
CD2/CD2R 20 µl/ml	7,72	1,02	7,42	1,61
PMA 10 ng/ml	5,93	0,89	5,68	0,45

35

Tabla 2: Aumento en porcentaje de la activación de linfocitos T auxiliares/inductores y T citotóxicos/supresores mediante pectina cítrica modificada PectaSol-C (PCMP)				
	Activación de linfocitos T auxiliares/inductores		Activación de linfocitos T citotóxicos/supresores	
Tratamiento	Aumento %	DT	Aumento %	DT
No tratado	0,00	0,00	0,00	0,00
	Activación de linfocitos T auxiliares/inductores		Activación de linfocitos T citotóxicos/supresores	
Tratamiento	Aumento %	DT	Aumento %	DT
PCMP-10 µg/ml	0,00	0,00	0,00	0,00
PCMP-20 µg/ml	0,00	0,00	0,00	0,00
PCMP-50 µg/ml	0,00	0,00	16,77	3,32
PCMP-100 µg/ml	7,25	5,13	19,49	13,78
PCMP-200 µg/ml	9,73	6,88	29,65	10,20
PCMP-400 µg/ml	0,00	0,00	103,11	5,60
PCMP-800 µg/ml	3,88	0,32	139,80	17,20
T2CA 50 µg/ml	22,57	7,79	107,43	14,72
CD2/CD2R 20 µl/ml	187,42	24,55	103,32	27,22
PMA 10 ng/ml	120,86	20,88	54,45	2,15

Activación de linfocitos B:

- 5 La activación de linfocitos B y aumento porcentual por encima del control no tratado se proporcionan en las Tablas 3 y 4, y en los respectivos gráficos en las Fig. 6 y 7. Se observó un aumento dependiente de la dosis y significativo del nivel de activación de linfocitos B mediante PCMP, aunque más bajo que en los controles positivos T2CA y PWM.

Tabla 3: Efecto de la pectina cítrica modificada PectaSol-C (PCMP) sobre la activación de linfocitos B		
Tratamiento	Activación (%)	DT
No tratado	2,40	0,33
PCMP-10 µg/ml	2,42	0,26
PCMP-20 µg/ml	2,63	0,04
PCMP-50 µg/ml	2,75	0,10
PCMP-100 µg/ml	2,67	0,10
PCMP-200 µg/ml	3,93	0,04
PCMP-400 µg/ml	5,83	1,01
PCMP-800 µg/ml	7,73	0,51
T2CA 50 µg/ml	7,77	1,69
PWM 10 µg/ml	23,39	2,43
PWM 25 µg/ml	28,36	7,28

Tabla 4: Aumento en porcentaje de la activación de linfocitos B mediante la pectina modificada PectaSol-C (PCMP)		
Tratamiento	Aumento %	DT
No tratado	0,00	0,00
PCMP-10 µg/ml	1,62	1,15
PCMP- 20 µg/ml	11,57	8,18
PCMP- 50 µg/ml	15,65	5,96
Tratamiento	Aumento %	DT
No tratado	0,00	0,00
PCMP- 100 µg/ml	12,28	5,72
PCMP- 200 µg/ml	65,58	12,23
PCMP- 400 µg/ml	148,54	38,35
PCMP- 800 µg/ml	227,38	33,34
T2CA 50 µg/ml	222,43	12,91
PWM 10 µg/ml	893,23	119,69
PWM 25 µg/ml	1116,72	236,32

Activación de linfocitos NK:

- 5 Los datos de activación de linfocitos NK y el aumento porcentual por encima del control no tratado se proporcionan en las Tablas 5 y 6, y los respectivos gráficos en las Fig. 8 y 9, respectivamente. La PCMP demostró una buena activación de linfocitos NK dependiente de la dosis, lo que muestra el potencial inmunoestimulador del compuesto.

Tabla 5: Efecto de la pectina modificada PectaSol-C (PCMP) sobre la activación de linfocitos NK		
Tratamiento	Activación (%)	DT
No tratado	3,14	1,46
PCMP-10 µg/ml	3,38	1,18
PCMP- 20 µg/ml	3,41	1,34
PCMP- 50 µg/ml	6,17	1,28
PCMP- 100 µg/ml	9,85	5,69
PCMP-200 µg/ml	13,45	7,12
PCMP-400 µg/ml	21,73	0,89
PCMP-800 µg/ml	29,56	1,14
T2CA 50 µg/ml	34,67	7,93
IL-2 3,3 ng/ml	8,80	4,62
IL-2 6,6 ng/ml	13,30	1,12

Tabla 6: Aumento en porcentaje de la activación de linfocitos NK mediante la pectina modificada PectaSol-C (PCMP)		
Tratamiento	Aumento %	DT
No tratado	0,00	0,00
PCMP-10 µg/ml	10,67	6,87
PCMP- 20 µg/ml	10,45	4,34
PCMP- 50 µg/ml	130,61	73,87
PCMP- 100 µg/ml	298,58	182,98
PCMP-200 µg/ml	438,75	238,35

Tabla 6: Aumento en porcentaje de la activación de linfocitos NK mediante la pectina modificada PectaSol-C (PCMP)		
Tratamiento	Aumento %	DT
PCMP-400 ug/ml	682,86	195,77
PCMP-800 ug/ml	945,31	224,33
T2CA 50 µg/ml	1071,48	145,50
IL-2 3,3 ng/ml	175,65	9,59
IL-2 6,6 ng/ml	383,77	130,11

HNK y PCM presentan sinergia en la inhibición del cáncer

- 5 Para probar los efectos sinérgicos de PCM y HNK en la inhibición del cáncer, se seleccionaron para el análisis las células de la línea celular BEL-7404 de cáncer de hígado como una línea celular de cáncer representativa.

Procedimientos experimentales:

- 10 Se realizaron ensayos de MTT para probar la viabilidad celular después del tratamiento con PCM y HNK, de forma individual o combinada.

Resultados

- 15 Después de 72 horas de tratamiento, PCM y HNK demostraron citotoxicidad sobre las células BEL-7404 de una manera dependiente de la dosis. PCM al 1,0 % mostró el 51,3 % de inhibición de la proliferación celular, mientras que HNK 10 µg/ml había mostrado ya el 68,7 % de inhibición del crecimiento celular. En cuanto al tratamiento de combinación de dosis bajas de PCM y HNK, las células BEL-7404 mostraron una reducción significativa de la viabilidad, en comparación con los tratamientos individuales o con el tratamiento con vehículo. Los datos indican claramente que PCM y HNK tienen efectos sinérgicos sobre las células BEL-7404. Estos datos se reflejan en la Figura 1. Como se refleja en la Figura 1, en el análisis se utilizaron HNK 5 mcg/ml y PCM al 0,75 %. La PCM sola presentó una inhibición de alrededor del 20 %, HNK solo de alrededor del 25 % y juntos, la inhibición aumentó hasta por encima del 90 %.
- 25 Por lo tanto, la administración de PCM mejora la capacidad de HNK para destruir células cancerosas y retardar su evolución. Cuando se combinaron en cantidades sinérgicas, la combinación de HNK y PCM, u otras pectinas y alginatos similares que son solubles en agua y se metabolizan de forma directa y/o se absorben por mamíferos tales como seres humanos, animales comerciales tales como vacas, caballos y cerdos, y animales veterinarios como perros y gatos, inhiben la formación, evolución y transformación de una amplia diversidad de cánceres. El siguiente listado no pretende ser limitativo, pero la combinación parece eficaz frente a cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de riñón, etc. Dado que la acción de HNK parece dirigida, al menos en parte, a través de la activación de la caspasa, y el resultado sinérgico de la coadministración de PCM y HNK, debido en parte a la capacidad de la PCM para unirse a Gal3 en la superficie de los cánceres (sobre la superficie de tumores sólidos en donde se presenta y sobre células cancerosas en donde el cáncer no se caracteriza por tumores sólidos) y, por lo tanto, presenta mejor las células cancerosas para la citotoxicidad de HNK, la combinación sinérgica debería observarse en general frente a todos los tumores sólidos, así como a tumores no sólidos que expresen moléculas de Gal3 en su superficie, tales como la LLC (leucemia linfocítica crónica) y el mieloma múltiple.
- 30
- 35
- 40 La PCM y HNK están disponibles de forma comercial en muchas formas. Es preferente la administración oral, pero la administración i.p., i.m., i.v. y subcutánea, así como la administración a través de las membranas mucosas, por ejemplo, a través de supositorios rectales y vaginales, también están abarcadas en la presente invención. Puede lograrse una inhibición superior del cáncer proporcionando una formulación de dosis unitaria de una cantidad sinérgica de HNK y PCM en un único comprimido, cápsula, polvo o forma similar. Por lo tanto, se contempla en la presente invención una cápsula o comprimido con una cantidad sinérgica de HNK y PCM, ya sea solo o, preferentemente, con un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 45

- Es preferente un régimen o administración diario de la combinación sinérgica de la presente invención. Las cantidades mayores que se pueden utilizar para la administración sobre una base menos frecuente pueden perderse a través de la excreción o retenerse de forma insuficiente. Como alternativa, por ejemplo, está claramente contemplada y prevista una administración más frecuente de dosificaciones más pequeñas, tres veces al día, en particular para dosificaciones más mayores contempladas para las realizaciones de la presente invención, en donde la combinación sinérgica se administra a fin de retardar o inhibir la evolución de un cáncer existente o inhibir su transformación a un cáncer metastásico.
- 50

En general, puede utilizarse cualquier poliurónido que se metabolice fácilmente y sea soluble en agua, y presente grupos funcionales de ácido galacturónico esterificados de forma parcial, u otros grupos funcionales que tengan la capacidad de unirse a Gal3 en la superficie de tumores sólidos. Está disponible una diversidad de pectinas y alginatos que se ajustan a esta descripción y se discuten en la bibliografía. Aunque la PCM es preferente dado que es la más estudiada y es la más ampliamente disponible de esta clase de compuestos, pueden utilizarse en su lugar otros compuestos o puede utilizarse una combinación de estos compuestos anticancerosos de bajo peso molecular (por debajo de los 40.000 daltons y, preferentemente, por debajo de los 15.000 daltons) que se unen a Gal3. A partir de los datos proporcionados en la presente solicitud de patente, los expertos en la materia tienen la capacidad de calcular intervalos de dosificación apropiados para tipos específicos de cánceres y valorar los protocolos de administración. Para potenciar los efectos preventivos y terapéuticos de la invención pueden añadirse compuestos, agentes quimioterapéuticos, productos vegetales y otros agentes adicionales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un poliurónido que presenta la capacidad de unirse a galectina 3 (Gal3) en la superficie de células cancerosas para su uso en un método de inhibición del cáncer en un mamífero que necesita el mismo, que comprende administrar una cantidad sinérgica de honokiol (HNK) y dicho poliurónido durante un periodo de tiempo suficiente para inhibir dicho cáncer, en el que dicho poliurónido es pectina cítrica modificada (PCM).
- 10 2. Honokiol (HNK) para su uso en un método de inhibición del cáncer en un mamífero que necesite el mismo, que comprende administrar una cantidad sinérgica de dicho HNK y un poliurónido que presenta la capacidad de unirse a galectina 3 (Gal3) en la superficie de células cancerosas durante un periodo de tiempo suficiente para inhibir dicho cáncer, en el que dicho poliurónido es PCM.
- 15 3. El poliurónido para su uso como se define en la reivindicación 1 u honokiol para su uso como se define en la reivindicación 2, en el que dicho método comprende administrar 5-500 mg/kg/día de HNK y 15-700 mg/kg/día de PCM.
- 20 4. El poliurónido u honokiol para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha administración se acompaña de la administración de un agente quimioterapéutico adicional.
- 25 5. Una composición de materia que comprende una cantidad de HNK y una cantidad de PCM en cantidades que, cuando se administran a un mamífero que necesita la misma, proporciona un grado sinérgico de inhibición del cáncer, superior a los efectos inhibidores logrados mediante la administración de HNK o PCM solo.
- 30 6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicha composición está en forma de un comprimido, cápsula, supositorio o polvo.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho comprimido, cápsula, supositorio o polvo comprende suficiente HNK y PCM para proporcionar una dosificación de 10-500 mg/kg/día de HNK y de 15-700 mg/kg/día de PCM.

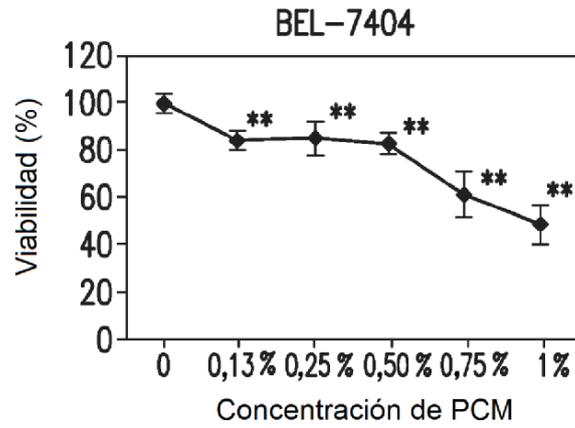


FIG. 1A

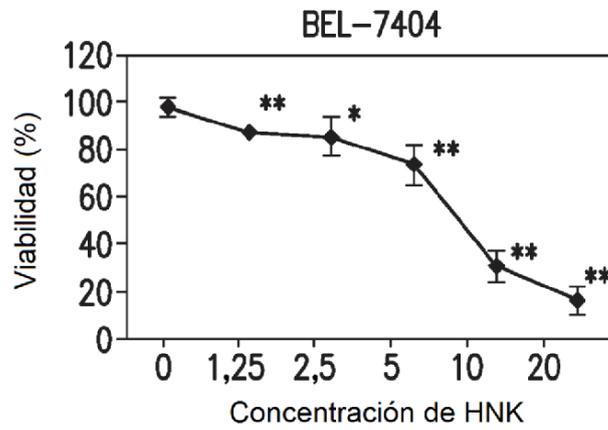


FIG. 1B

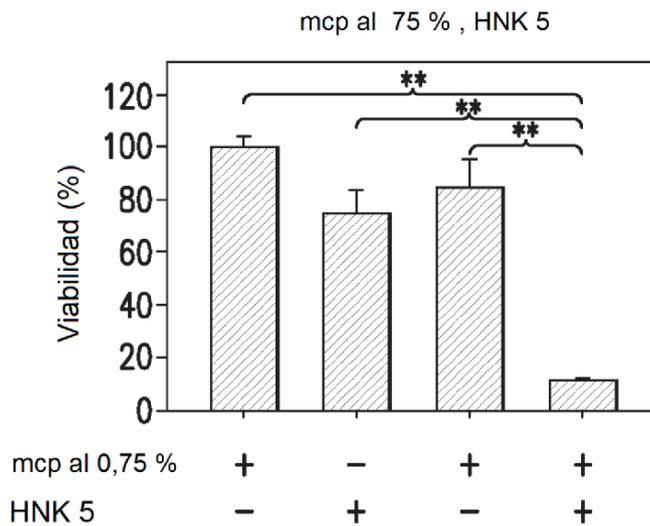


FIG. 1C

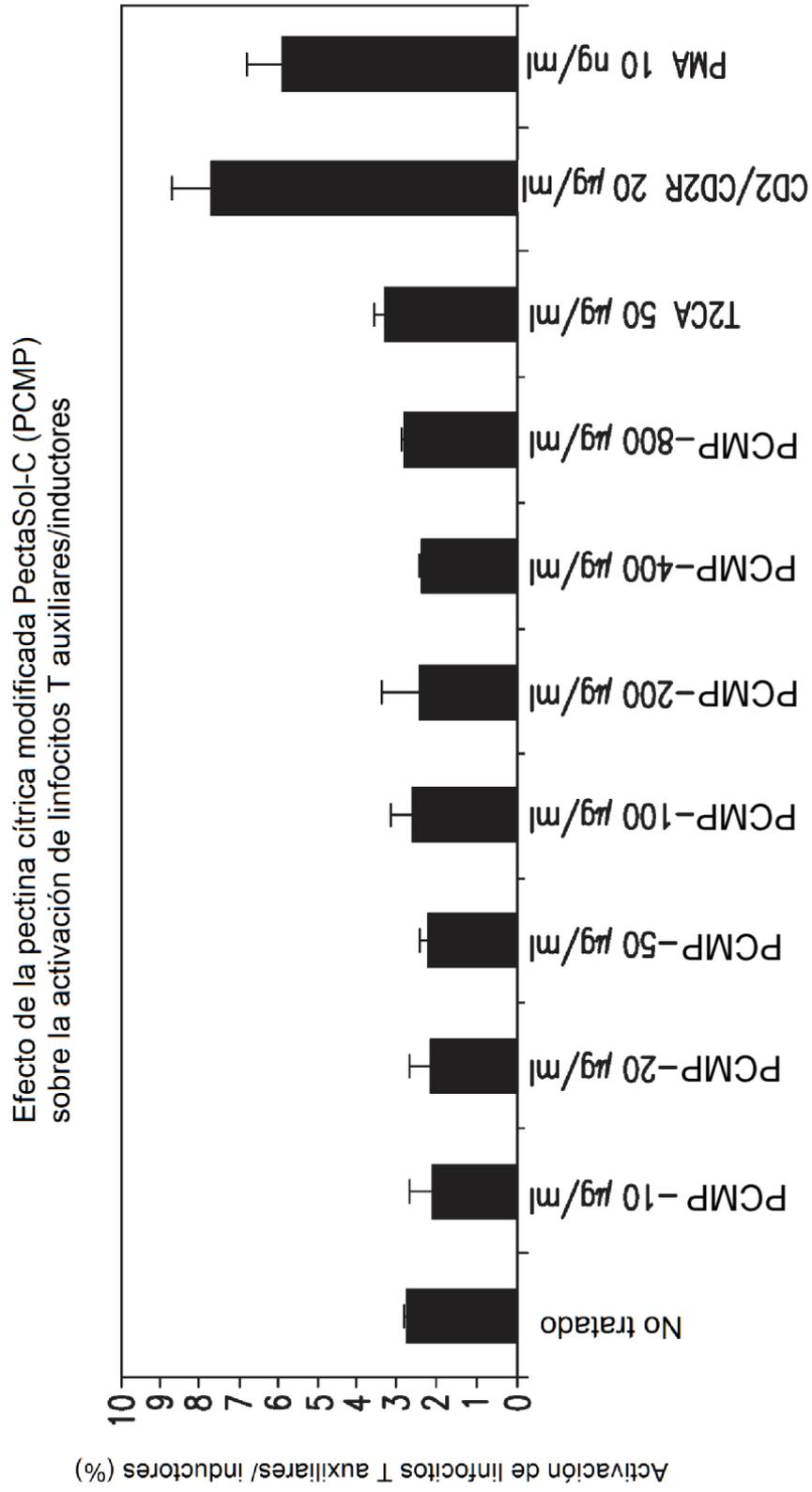


FIG.2

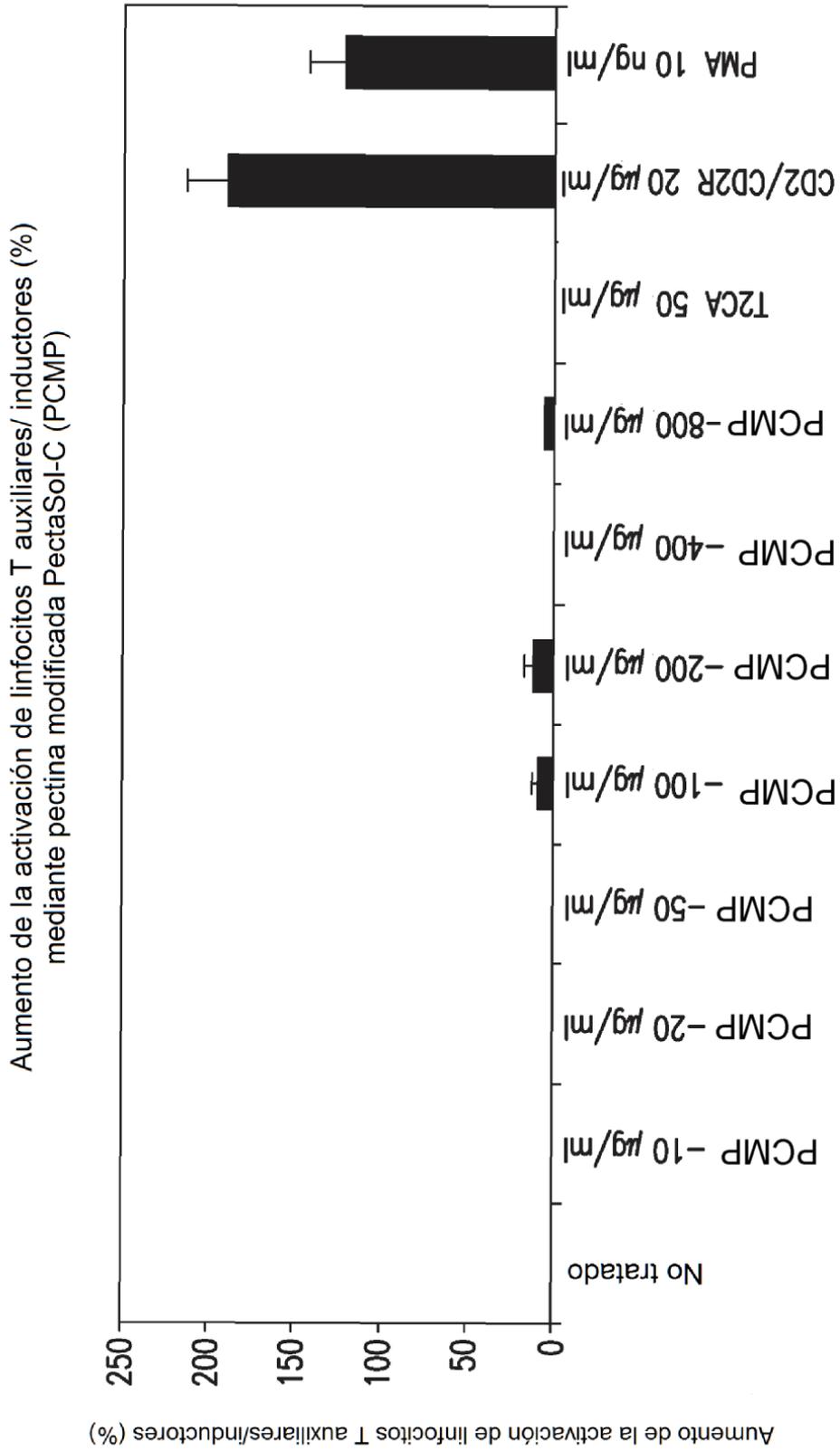


FIG.3

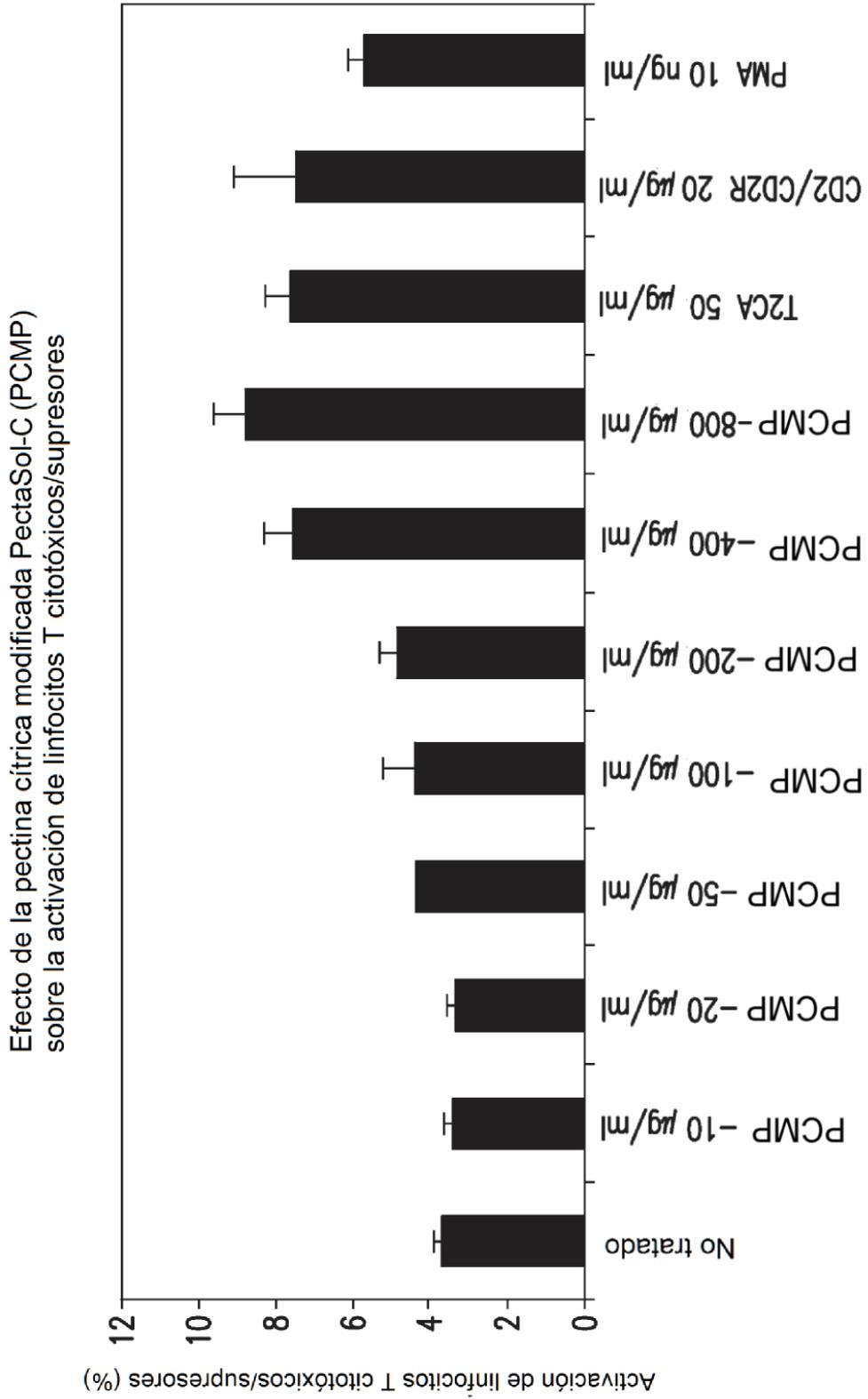


FIG.4

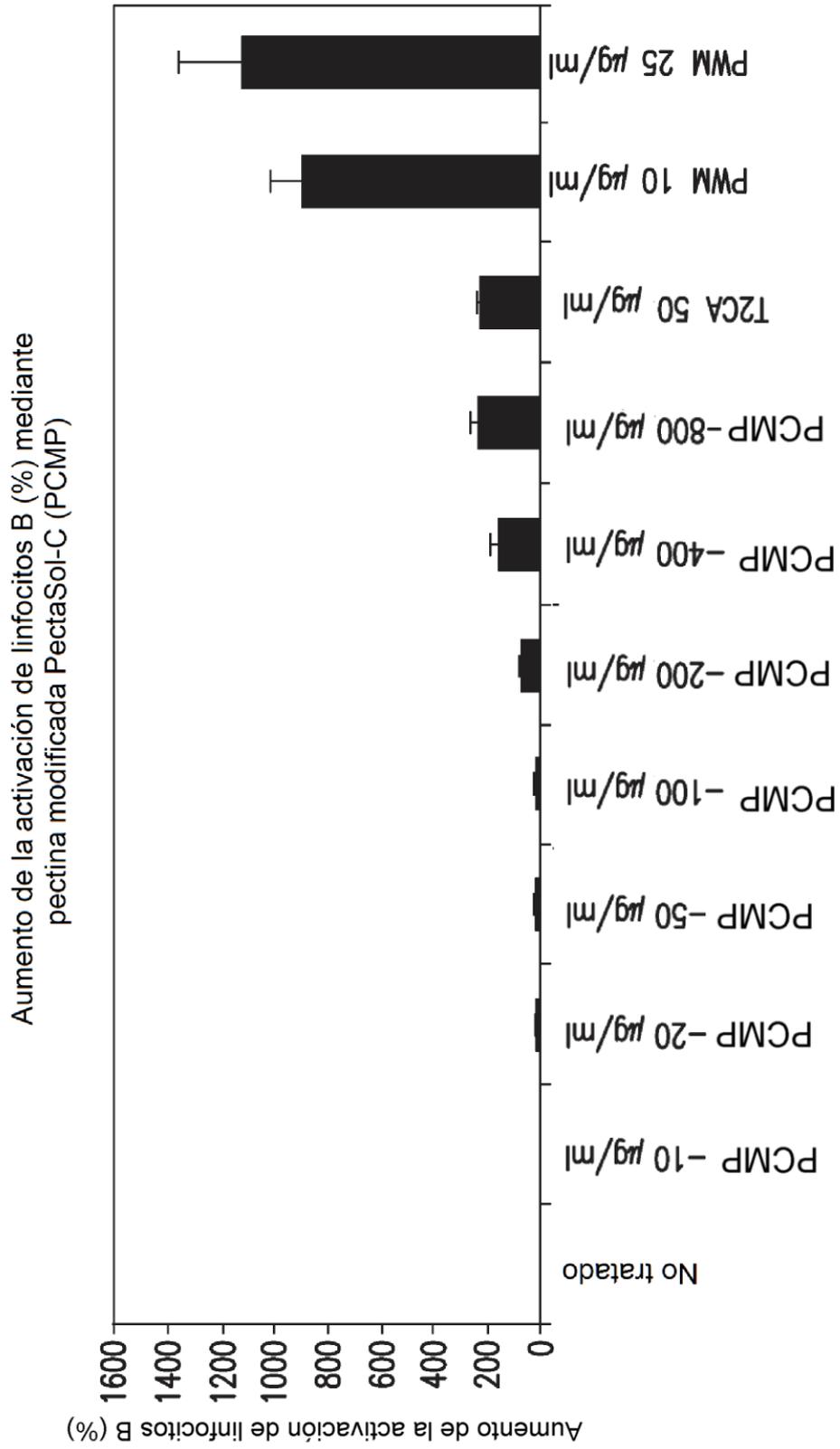


FIG.5

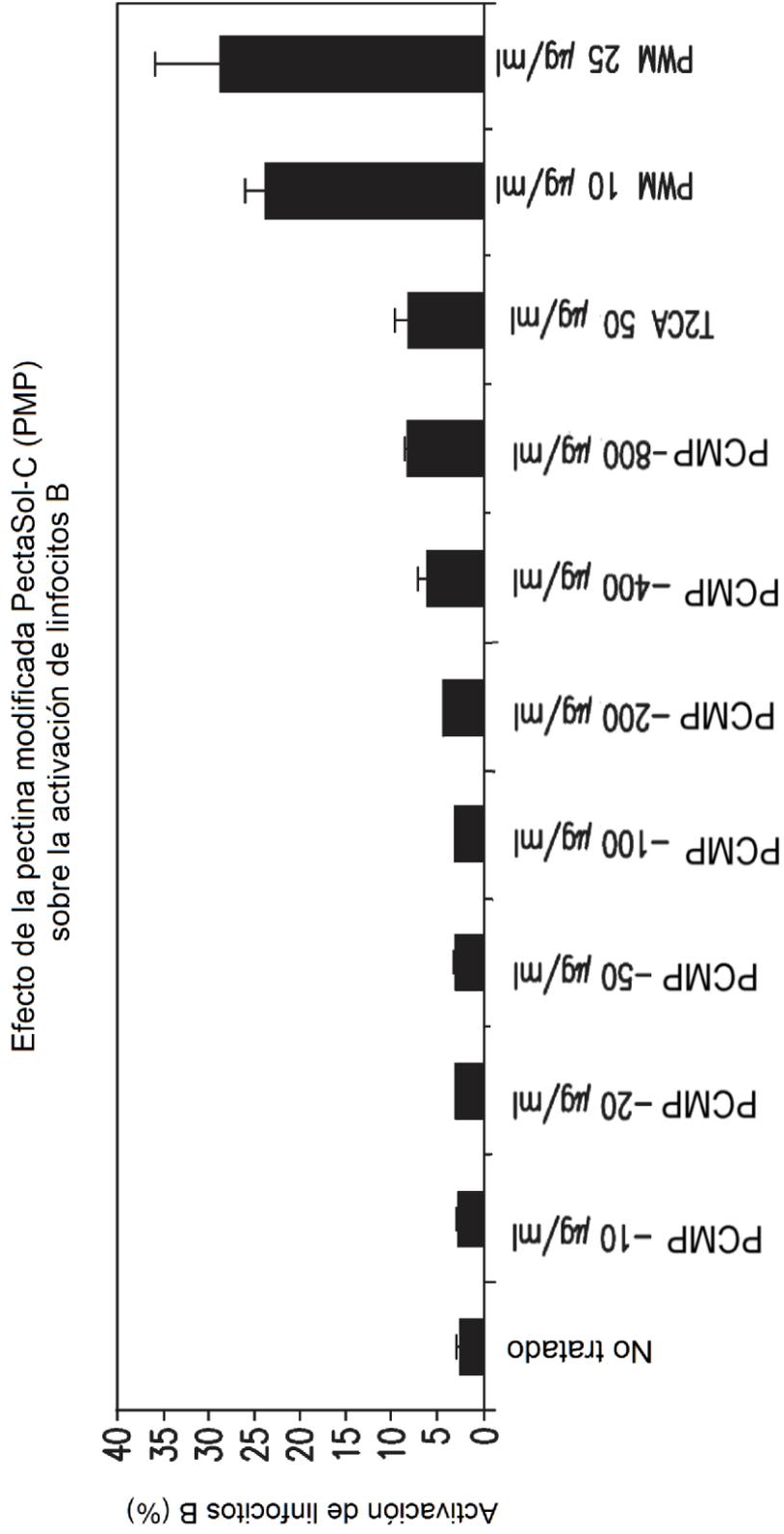


FIG.6

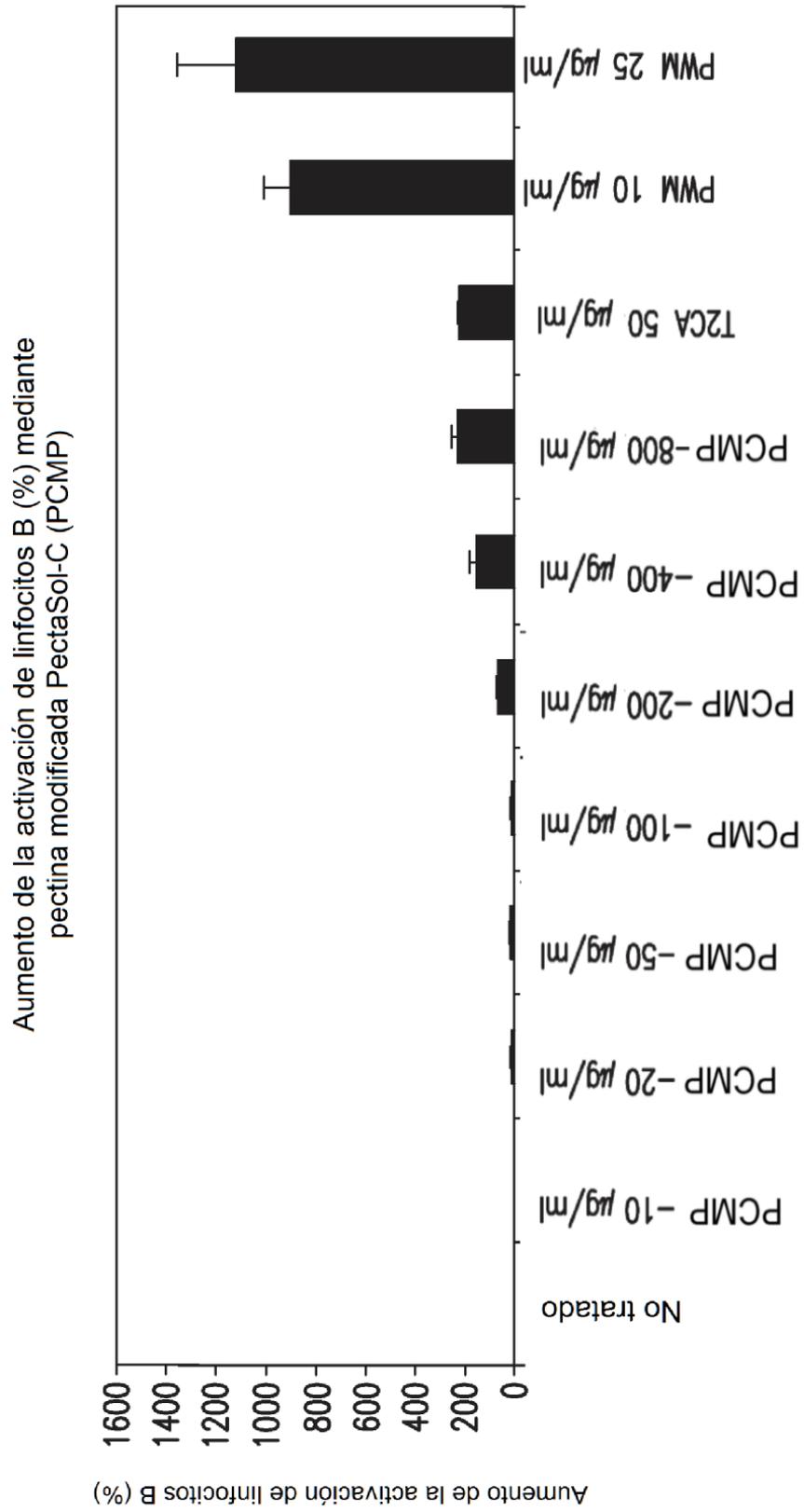


FIG.7

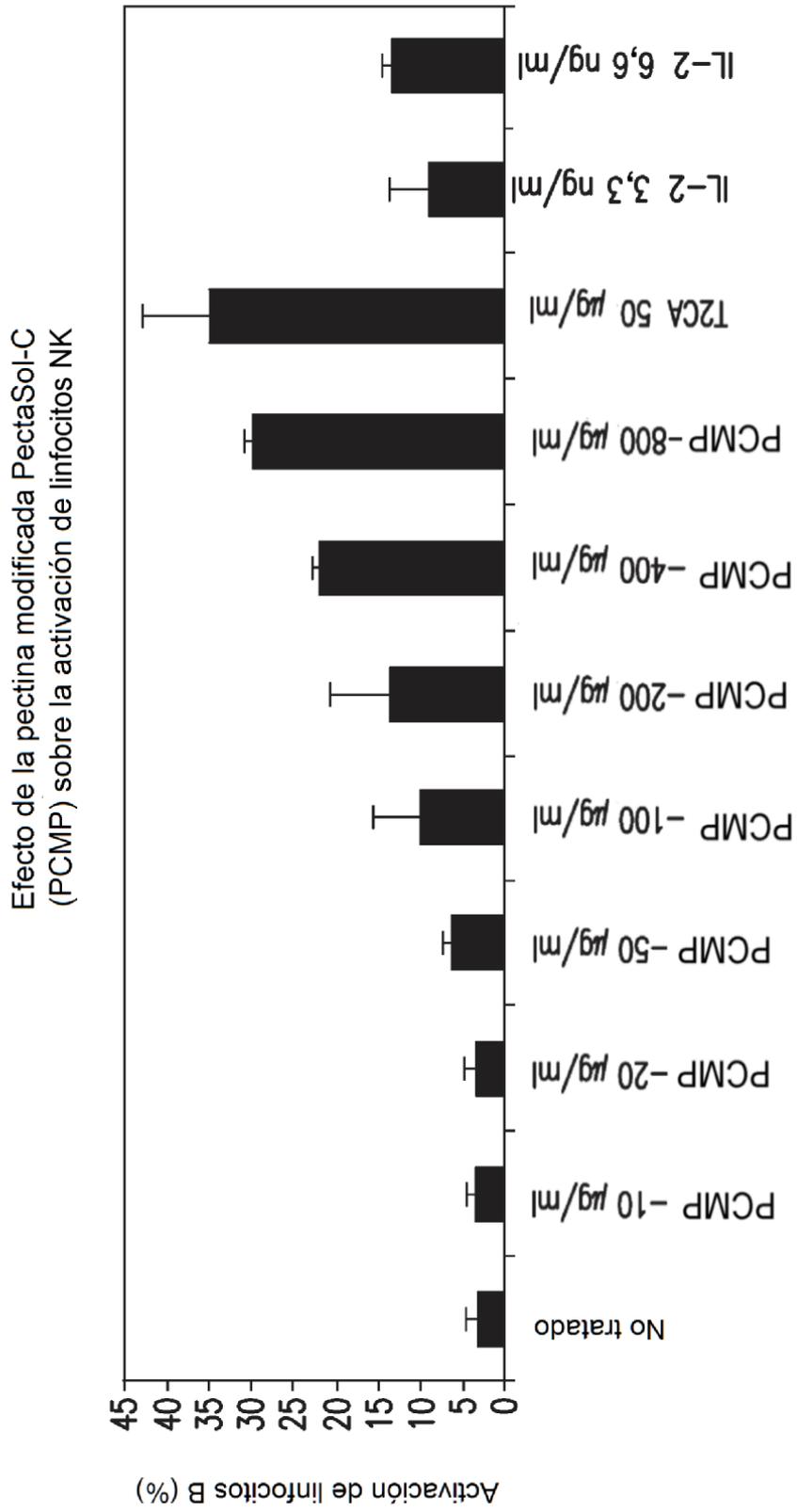


FIG.8

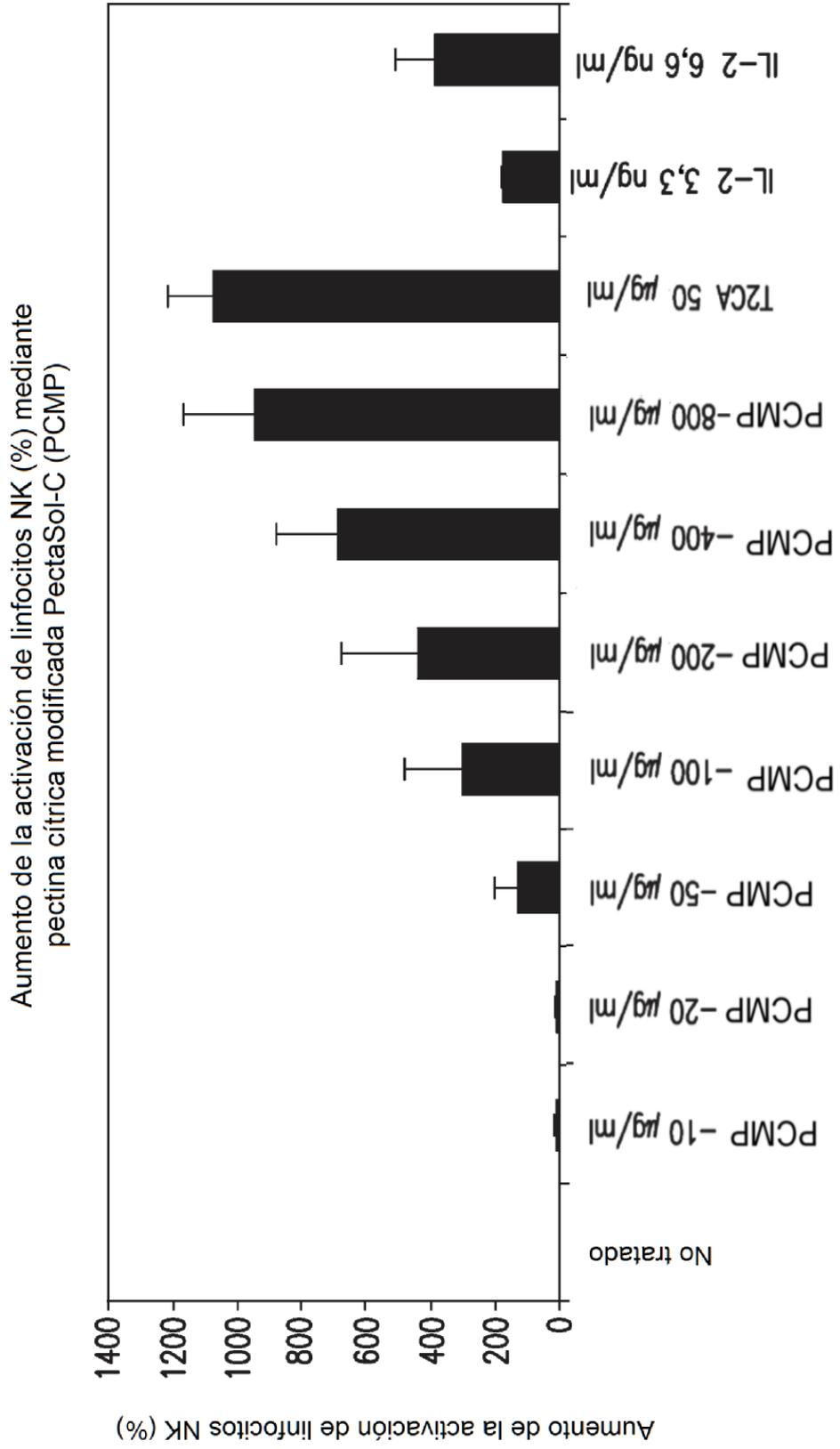


FIG.9