

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 727**

51 Int. Cl.:

A61K 31/57 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013 PCT/EP2013/060801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13175009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013 E 13724304 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2854817**

54 Título: **Acetato de ulipristal para la prevención y el tratamiento de tumores de mama**

30 Prioridad:

25.05.2012 EP 12305586

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

15.06.2018

73 Titular/es:

**LABORATOIRE HRA PHARMA (50.0%)
15, rue Béranger
75003 Paris, FR y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RESCHE-RIGON, MICHÈLE;
LEVY, DELPHINE;
GAINER, ERIN;
GOMPEL, ANNE;
FORGEZ, PATRICIA y
DESREUMAUX-COMMUNAL, LAUDINE.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 727 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

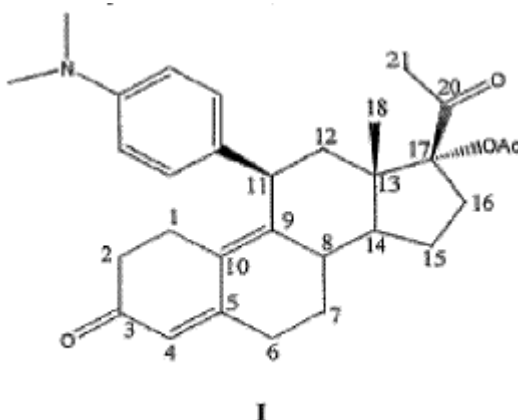
Acetato de ulipristal para la prevención y el tratamiento de tumores de mama

La presente invención se refiere a la prevención y el tratamiento de tumores de mama con acetato de ulipristal.

Antecedentes de la invención

- 5 El acetato de ulipristal (UPA) es un modulador del receptor de progesterona que se une eficazmente e inhibe el receptor de progesterona en los tejidos diana de la progesterona.

UPA, anteriormente conocido como CDB-2914, designa 17 α -acetoxi-11 β -[4-N, N-dimetilamino-fenil]-19-norpregna-4, 9-dieno-3, 20-diona, representado por la fórmula I:



- 10 UPA, y los métodos para su preparación, se describen, p. ej., en las patentes de EE.UU. n° 4.954.490; n° 5.073.548; y n° 5.929.262, así como en las solicitudes de patente internacional WO2004/065405 y WO2004/078709.

El UPA ha sido aprobado para anticoncepción de urgencia (con el nombre comercial EllaOne®) y para el tratamiento de fibromas uterinos (con el nombre comercial Esmya®). Se han propuesto otras posibles aplicaciones clínicas en Chabbert-Buffet *et al.*, *Human Reproduction*, 2005, 11 (3): 293-307.

- 15 Otras antiprogesterinas tales como la mifepristona y la onapristona se desarrollaron para el tratamiento del cáncer de mama. La administración de mifepristona u onapristona en una segunda o tercera línea de tratamiento, en 123 mujeres posmenopáusicas con cánceres de mama metastásicos, indujo una tasa de respuesta objetiva y estabilización de la enfermedad en el 11% y 43% de los pacientes, respectivamente (Romieu *et al.* 1987, *Cancer Res.* 74 (4): 455-461; Klijn, *et al.*, 1989, *Cancer Res.* 49 (11): 2851-2856). Desafortunadamente, los estudios clínicos no se sostuvieron debido a los efectos secundarios tóxicos antiglicocorticoides y en el hígado de mifepristona y onapristona, respectivamente. Wiehle *et al.* (*Oncology reports*, 2007, 18:167-174) investigaron los efectos de CDB-4124 sobre carcinogénesis mamaria inducida por DMBA en ratas en comparación con RU486. Whiele *et al.* Concluyeron que CDB-4124 podía usarse como tratamiento adyuvante para pacientes con cáncer de mama.

- 25 La exposición prolongada a UPA puede afectar a tejidos sensibles a las hormonas, y particularmente al tejido mamario también. Sin embargo, solo se publicaron estudios de transactivación del gen indicador en la estirpe celular de cáncer de mama T-47D (Attardi *et al.*, 2002, *Mol. Cell Endocrinol.* 188 (1-2): 111-123; Attardi *et al.*, 2004, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88 (3): 277-288).

Todavía hay necesidad de un agente terapéutico para tratar, e incluso evitar tumores de mama, sin producir efectos secundarios o reducidos.

30 Compendio de la invención

Los inventores ahora proponen un método para evitar o tratar un tumor de mama en un paciente, cuyo método comprende administrar acetato de ulipristal (UPA) o cualquiera de sus metabolitos.

Por lo tanto, se proporciona acetato de ulipristal (UPA) o cualquiera de sus metabolitos para su uso en la prevención o el tratamiento de un tumor de mama en un paciente.

- 35 En una realización preferida, el paciente lleva una mutación en el gen BRCA1 y/o BRCA2.

En una realización particular preferida, se usa acetato de ulipristal (UPA) o cualquiera de sus metabolitos en la prevención de un tumor de mama en un paciente que lleva una mutación en el gen BRCA1 y/o BRCA2.

En otra realización preferida, el acetato de ulipristal (UPA) o cualquiera de sus metabolitos se usa en el tratamiento de un tumor de mama en un paciente, en donde el tumor de mama es preferiblemente un carcinoma de mama.

Descripción detallada de la invención

5 El "paciente" significa cualquier persona que necesite el tratamiento preventivo o curativo de la invención, preferiblemente una mujer. Sin embargo, los hombres también están incluidos, ya que también pueden ser vulnerables a los tumores de mama.

Preferiblemente, al paciente se le ha diagnosticado una mutación en el gen BRCA1 y/o BRCA2.

BRCA1 y BRCA2 son genes supresores de tumores.

10 Los fenómenos mutacionales del locus BRCA1 o BRCA2 pueden implicar supresiones, inserciones y mutaciones puntuales en la secuencia codificante y la secuencia no codificante. Las supresiones pueden ser del gen completo o de solo una parte del gen. Las mutaciones puntuales pueden dar como resultado codones de terminación, mutaciones de desplazamiento de marco o sustituciones de aminoácidos. Las mutaciones somáticas son las que ocurren solo en algunos tejidos, p. ej., en el tejido tumoral, y no se heredan en la estirpe germinativa. Las mutaciones de estirpe germinativa se pueden encontrar en cualquiera de los tejidos o células del cuerpo y se heredan. Si solamente está mutado un solo alelo, se indica una predisposición al cáncer de mama.

15 En una realización particular, el paciente puede llevar una copia o dos copias de alelos predisponentes de BRCA1 o BRCA2.

20 Se cree que los alelos predisponentes de BRCA1 o BRCA2 son recesivos para los alelos naturales; es decir, las células que contienen al menos un alelo BRCA1 o BRCA2 natural no son cancerosas. Sin embargo, las células que contienen un alelo BRCA1 o BRCA2 natural y un alelo predisponente pueden ocasionalmente sufrir la pérdida del alelo natural, ya sea por mutación aleatoria o por pérdida cromosómica durante la división celular. Toda la descendencia de dicha célula mutante carece de la función natural de BRCA1 o BRCA2 y puede convertirse en tumores. Por lo tanto, los alelos predisponentes de BRCA1 o BRCA2 son propensos al cáncer y la sensibilidad se hereda de manera dominante.

25 La mayoría de los alelos mutantes son sin sentido o por desplazamiento del marco de lectura y producen proteínas truncadas que se predice que varían en longitud del 5% al 99% de la proteína completa. Muchas de estas mutaciones residen en el exón 11 del gen BRCA1 que comprende el 61% de la región codificante de BRCA1. La secuencia de ADNc de BRCA1 completa y las regiones de codificación del gen BRCA1 se han descrito en la patente de EE.UU. n° 5.747.282.

30 Las mutaciones en BRCA1 o BRCA2 pueden detectarse por cualquier método conocido en la técnica.

La prueba de diagnóstico de BRCA actual de Myriad, BRACAnalysis®, utiliza una combinación de dos tecnologías tradicionales (secuenciación de Sanger y PCR) para identificar mutaciones asociadas a un riesgo significativo de cáncer de mama en los genes BRCA1 y BRCA2.

35 Otros métodos para el cribado de las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 incluyen el análisis del polimorfismo de configuración monocatenario (SSCP) y la secuenciación de ADN seleccionada de variantes génicas, o DHPLC y la secuenciación del ADN de variantes génicas.

Se han descrito aún otros métodos, incluidos sistemas basados en proteínas para detectar mutaciones en el gen BRCA1 (Pat. de EE.UU. n° 5.965.377, n° 6.514.713).

40 El término "tumor" se refiere a la presencia de células que poseen características tales como crecimiento atípico o morfología, incluidos proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y tasa de proliferación y determinadas características morfológicas características. "Tumor" incluye neoplasmas tanto benignos como malignos (es decir, cancerosos). Están comprendidos adenomas y quistes. Los cánceres de mama incluyen carcinomas de mama. El cáncer de mama puede comenzar en diferentes áreas de la mama: los conductos, los lóbulos o, en algunos casos, el tejido que se encuentra en el medio. En el contexto de la presente invención, se engloba cualquier tipo de tumor de mama o cáncer de mama, incluidos cánceres de mama no invasivos, invasivos, recurrentes y metastásicos.

En una realización concreta, al paciente se le ha diagnosticado un cáncer hereditario de mama y ovario (HBOC).

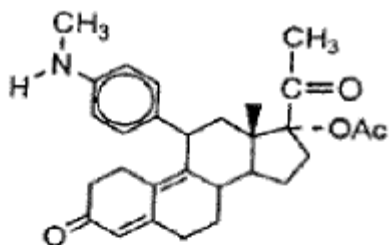
50 En la presente memoria se describe un método preventivo y terapéutico contra el tumor de mama. "Prevención" significa que se administra UPA o cualquiera de sus metabolitos a un paciente asintomático o que no presenta un tumor de mama. Más concretamente, el paciente puede estar en situación de riesgo de desarrollar dicho tumor de mama, p. ej., a la vista de los antecedentes familiares o del estado del gen BRCA1 y/o BRCA2. Dicha prevención tiene como objetivo reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

"Tratamiento terapéutico" o "tratamiento" significa que UPA o cualquiera de sus metabolitos se administra a un paciente al que se ha diagnosticado un tumor de mama. El tratamiento alivia los síntomas de la enfermedad, ralentiza la evolución de la enfermedad, puede conducir a una remisión o a una cura completa de la enfermedad.

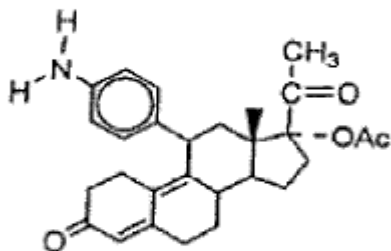
5 En particular, se ha demostrado que UPA antagoniza la proliferación de células tumorales, en particular en lóbulos y galactóforos (o células canaliculares), en particular en células mutantes BRCA1.

10 En una realización concreta, la paciente, que puede estar en situación de riesgo de desarrollar un tumor de mama, pero no necesariamente, puede necesitar además anticoncepción. Esto es particularmente útil cuando la paciente no tiene anticoncepción regular. Si es así, puede proponerse UPA o cualquiera de sus metabolitos, en una forma y una dosis adaptadas para proporcionar tanto una anticoncepción regular como prevención del tumor de mama. En otra realización, la paciente puede tener fibromas uterinos, y necesitar tanto un tratamiento contra fibromas uterinos como un tratamiento terapéutico o preventivo contra un tumor de mama. En ese caso, UPA o cualquiera de sus metabolitos, también pueden proponerse en una forma y dosis adaptadas para proporcionar tanto tratamiento contra fibromas uterinos como prevención o tratamiento de un tumor de mama.

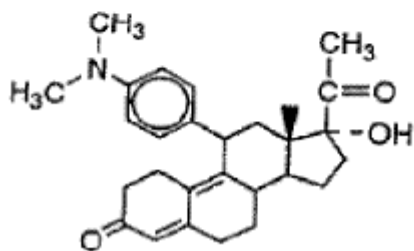
15 Se usa preferiblemente acetato de ulipristal (UPA). Sin embargo, también podrían usarse metabolitos de UPA. Los metabolitos de acetato de ulipristal, incluyen los descritos en Attardi *et al.*, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, 88: 277-288, p. ej., CDB-2914 monodesmetilado (CDB-3877); CDB-2914 didesmetilado (CDB-3963); 17 α -hidroxi CDB-2914 (CDB-3236); derivado de CDB-2914 con anillo A aromático (CDB-4183). Preferiblemente, el metabolito es CDB-2914 monodesmetilado (CDB-3877).



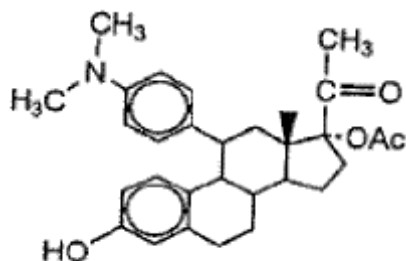
CDB-2914 monodesmetilado



CDB-2914 didesmetilado



17 α -hidroxi CDB-2914



CDB-2914 con anillo A aromático

5 El UPA o sus metabolitos pueden administrarse por diversas vías, p. ej., por vía oral, intravenosa o transdérmica. Una vía de administración preferida es la vía oral. También es posible una inyección en la zona del tumor. Se incluyen otras vías de administración, entre ellas la vía vaginal o intrauterina. Los dispositivos, en particular los dispositivos vaginales o intrauterinos, que permiten la liberación sostenida de UPA o sus metabolitos pueden ser particularmente útiles. Pueden contemplarse además implantes subcutáneos.

10 Los métodos y composiciones para preparar dosis individuales útiles son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas convencionales para preparar comprimidos y píldoras, que contienen principios activos, se describen en la referencia típica, Chase *et al.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, (16ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA, EE. UU., 1980). ("Remington's"), en las páginas 1553 a 1584. Las técnicas convencionales para preparar polvos, y su composición se describen en las páginas 1535 a 1552 de referencia. Las técnicas convencionales para recubrir presentaciones farmacéuticas se describen en las páginas 1585 a 1593 de Remington's.

15 Las presentaciones sólidas orales son preferentemente comprimidos, que pueden estar recubiertos o sin recubrir, o cápsulas.

Las cápsulas son presentaciones sólidas que usan preferiblemente una cubierta de gelatina dura o blanda como recipiente para la mezcla del principio activo y los ingredientes inertes. Los procedimientos para la producción y fabricación de cápsulas de gelatina dura y elásticas blandas son bien conocidos en la técnica.

20 Los comprimidos pueden contener algunos excipientes que son diluyentes para aumentar la masa del principio activo de modo que sea posible la producción de un comprimido de tamaño práctico. También son necesarios aglutinantes, que son agentes que proporcionan cualidades cohesivas a los materiales en polvo. Se usan almidón, gelatina, azúcares como lactosa o dextrosa y gomas naturales y sintéticas. Los disgregadores son necesarios en los comprimidos para facilitar la disgregación del comprimido. Los disgregadores incluyen almidones, arcillas, celulosas, alginas, gomas y polímeros reticulados. Por último, se incluyen en los comprimidos pequeñas cantidades de materiales conocidos como lubricantes y fluidificantes para evitar la adhesión al material del comprimido a las superficies en el proceso de fabricación y para mejorar las características de flujo del material en polvo durante la fabricación. El dióxido de silicio coloidal se suele usar mucho como fluidificante y compuestos tales como el talco o los ácidos esteáricos se usan más frecuentemente como lubricantes. Los procedimientos para la producción y fabricación de comprimidos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 En una realización concreta, se usa acetato de ulipristal o uno de sus metabolitos en forma de comprimido no recubierto en donde el acetato de ulipristal o uno de sus metabolitos se mezcla con excipientes que son lactosa monohidratada, povidona (polivinilpirrolidona), croscarmelosa sódica y estearato de magnesio (p. ej., como se describe en la solicitud de patente internacional WO2010/066749).

Se prefieren los tratamientos a largo plazo, p. ej., durante un período de al menos 3 meses.

35 En el contexto de prevención, el tratamiento puede mantenerse varios años.

En el contexto de un tratamiento curativo, el UPA puede administrarse desde unos pocos días hasta varios meses o años, p. ej., durante al menos 3 meses hasta aproximadamente 5 años.

40 La dosis se puede adaptar dependiendo del estado específico y la gravedad del tumor, y del sexo y peso del paciente. Una dosis típica oscilaría entre 0,1 mg y 150 mg, preferiblemente entre 5 y 80 mg, aún preferiblemente entre 10 y 50 mg. Se prefieren la administración o administraciones diaria(s).

Los ejemplos y figuras ilustran la invención sin reducir su alcance.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Efectos de UPA en la transactivación del gen informador MMTV.

5 El gen informador MMTV-Luc se transfectó en células HBE: (A) solo, o en combinación, (B) con plásmidos de isoforma hPR-A y hPR-B, (C) hPR-A o (D) hPR-B. (E) Se transfectaron células T-47D con MMTV-Luc. Las células se trataron con P a 100 nM y/o UPA, o RU de 1 a 1.000 nM como se indica o con 100 nM cuando no se especifica. Los resultados corresponden a la inducción del pliegue de referencia (media \pm SEM, n = 3 para HBE y T-47D). *p < 0,05, **p < 0,001.

Figura 2: Efectos de UPA sobre la expresión del gen diana PR.

10 Se analizó la expresión de ARNm en células HBE y T-47D por RT-PCR cuantitativa para (A) FASN, (B) ciclina A, (C) BCL2 y (D) ALPL. Las células se trataron con P y/o UPA a 100 nM, y/o E2 a 10 nM. Los resultados corresponden a la inducción del pliegue de referencia (media \pm SEM, n = 5 para HBE y n = 2 para T47D). *p < 0,05, **p < 0,01.

Figura 3: Efectos de UPA sobre la transactivación del gen informador GRE.

15 El gen informador GRE-Luc se transfectó en (A) células HBE y en (B) células MCF-7. Las células se trataron con DEX y/o UPA a 100 nM. Los resultados corresponden a la inducción del pliegue de referencia (media \pm SEM, n = 13 para HBE y n = 3 para MCF-7). *p < 0,01, **p < 0,001.

Figura 4: Efectos de UPA sobre la expresión del gen diana GR.

Se analizó la expresión de ARNm en células HBE y MCF-7 por RT-PCR cuantitativa para (A) IEX-1, (B) G0S8, (C) ciclina A, (D) BCL2. Las células se trataron con DEX y/o UPA a 100 nM. Los resultados corresponden a la inducción del pliegue de referencia (media \pm SEM, n = 5 para HBE y n = 2 para MCF-7). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

20 Figura 5: Efecto de UPA sobre la proliferación de células 1 mediada por hormonas.

Se midió la proliferación celular mediante la incorporación de [3H] timidina en (A) células HBE, (B) células T-47D y (C) células MCF-7. Las células HBE se trataron durante 96 h y las células T-47D y MCF-7 se trataron 48 horas a la concentración de 100 nM para P, DEX, UPA y 10 nM para E2. Los resultados se expresan en porcentaje de referencia (media \pm SEM, n = 7 para HBE, n = 4 para T47D y n = 3 para MCF-7). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

25 Figura 6: Efectos de UPA sobre la apoptosis celular mediada por hormonas.

30 Se midió la apoptosis celular mediante cuantificación por citometría de flujo de la fase sub-G1 en (A) células HBE, (B) células T-47D y (C) células MCF-7. Las células HBE se trataron durante 96 h y las células T-47D y MCF-7 se trataron durante 48 horas a la concentración de 100 nM para P, DEX, UPA y 10 nM para E2. Los resultados se expresan en porcentaje de referencia (media \pm SEM, n = 9 para HBE, n = 3 para T-47D y n = 4 para MCF-7). *p < 0,05, **p < 0,001.

Figura 7: Expresiones de PR, ER y Ki67 en xenotrasplantes de tejido mamario.

35 Se analizaron las expresiones de ER, PR y Ki67 por inmunohistoquímica. (A) Imagen representativa para el marcaje de ER y PR en el tejido mamario original antes y en los trasplantes tratados en ratones. (B) Expresión de Ki67 en grupos de tratamiento con C, E2, E2+P, E2+P+UPA de tejidos trasplantados. Aumento \times 400. (C) Inducción del pliegue de referencia del índice mitótico (porcentaje de células positivas Ki67) en lóbulos y conductos (media \pm SEM, n = 4 en lóbulos y n = 6 en conductos). *p < 0,05.

Figura 8 muestra la inducción del índice mitótico (porcentaje de células positivas Ki67) en células lobulares de tejidos trasplantados portadoras de mutaciones de BRCA1 (BRCA1^{+/+}) o no (BRCA1^{-/-}), en respuesta a diversos tratamientos. Media \pm SEM.

40 Figura 9 muestra la inducción del índice mitótico (porcentaje de células positivas Ki67) en células canaliculares de tejidos trasplantados portadoras de mutaciones BRCA1 (BRCA1^{+/+}) o no (BRCA1^{-/-}), en respuesta a diversos tratamientos. Media \pm SEM.

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Impacto de UPA en la proliferación y la apoptosis de células epiteliales normales de mama (HBE) y en estirpes celulares de cáncer de mama

Materiales y métodos

Esteroides

El acetato de ulipristal (UPA) antagonista del receptor de progesterona y su metabolito desmetilado mono-N4 CDB-3877 (CDB) fueron proporcionados amablemente por HRA-Pharma (París, Francia). 17 β estradiol (E2), progesterona (P), dexametasona (DEX) y mifepristona/RU-486 (RU) se adquirieron en Sigma (St. Quentin Fallavier, Francia).

Procedimientos de cultivo celular

- 5 Las estirpes celulares T-47D y MCF-7 se mantuvieron respectivamente en RPMI 1640 y en medio DMEM enriquecido con suero de ternera fetal al 10% (PAA Laboratory, Les Mureaux, Francia). La estirpe celular T-47D procedía de un carcinoma de mama canalicular humano y expresó de manera constitutiva altas cantidades de PR (receptor de progesterona) y ER (receptor de estradiol). Se obtuvieron cultivos primarios de células epiteliales de mama humanas (HBE) de 20 mujeres (de 17 a 50 años de edad). El procedimiento utilizado para cultivar células
- 10 HBE está descrito con detalle por Gompel *et al.* (Gompel, *et al.*, 1986, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (5): 1174-1180). Las células HBE se mantuvieron en medio HAM F10 (PAA Laboratory, Les Mureaux, Francia) que contenía hidrocortisona (5 ng/ml), triyodo-L-tironina (6,5 ng/ml), coleratoxina (10 ng/ml), transferrina (5 mg/ml), insulina (0,016 U/ml), factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml) (Sigma, St. Quentin Fallavier, Francia) y suero humano al 5% (Etablissement Français du Sang). Los cultivos primarios de HBE expresan marcadores epiteliales, así como bajos
- 15 niveles de receptor de estradiol (ER) y PR inducido por estradiol (Malet, *et al.*, 1991. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73(1): 8-17; Courtin, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res. Treat.*).

Tratamientos con esteroides

- Después de la siembra, se cultivaron células durante 24 h en suero y medio exento de rojo fenol. A continuación, se
- 20 llevaron a cabo tratamientos en un medio exento de rojo de fenol que contenía un 5% de suero desprovisto de dextrano- carbón vegetal. Las células se trataron con P o DEX (100 nM), solas o en combinación con UPA, RU (1 nM a 1 μ M) o CDB-3877 (100 nM). Las células de referencia se trataron con etanol, a una concentración de etanol final de 10 1:1000 solo como vehículo o E2 (10 nM).

Ensayos con enzima informadora

- 25 Se transfectaron células con plásmidos del gen informador que contienen elementos sensibles a glucocorticoides y progesterona (GRE/PRE): 1) el MMTV-Luc es un activador de repetición terminal largo del virus tumoral mamario de ratón que contiene un palíndromo GRE/PRE y tres hemipalíndromos GRE/PRE aguas arriba al gen de luciferasa de luciérnaga en el vector pFC31, 2) el GRELuc contiene seis copias de palíndromo GRE/PRE corriente arriba del gen luciferasa de luciérnaga en el vector pBL. Cuando se indicó, las células HBE se transfectaron con plásmidos de expresión de isoformas PR humanas hPR-A y hPR-B construidos en vectores POP3. El activador del virus del
- 30 sarcoma de Rous aguas arriba del gen de la beta galactosidasa (pRSV- β -Gal) se transfectó en cada experimento como referencia. Las transfecciones se realizaron según las instrucciones del fabricante utilizando Lipofectamine o Lipofectamine LTX Reagents (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) para estirpes celulares de cáncer de mama o células HBE, respectivamente. Después de 24 h de transfección, el cáncer de mama y las células HBE se trataron con hormonas durante 24 h o 48 h, respectivamente. Al final del experimento, se lisaron las células y se determinó la
- 35 actividad de luciferasa usando el Assay System (Promega, Charbonnières-les-bains, Francia). Se evaluó la actividad de beta galactosidasa usando el Galacto Star kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) para normalizar los datos de actividad de luciferasa.

PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se extrajo todo el ARN usando el TriZOL Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia).

- 40 2 μ g de ARN total se sometieron a transcripción inversa (RT) usando cebadores aleatorios durante 1 h a 37°C. Se diluyeron 2 μ l de producto de RT (1:10) y se sometieron a PCR cuantitativa usando cebadores específicos de secuencia (300 nM) y mezcla maestra Brilliant SYBR GREEN QPCR (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, Francia) en un aparato Mx3000P (Agilent Technologies, Massy, Francia). Las condiciones fueron 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 30
- 45 segundos. Los valores de expresión génica se normalizaron para el gen constitutivo 36B4. El tiempo de tratamiento con esteroides se seleccionó para obtener la estimulación óptima para un gen dado. Se analizaron ARNm de ALPL y G0S8 después de 6 h de tratamiento. Se analizaron IEX-1, FASN y BCL2 después de 24 h de tratamiento. Se analizó ARNm de ciclina A después de 24 h para respuestas de GR o de 48 horas para respuestas de PR.

Incorporación de timidina tritiada

- 50 Después de 24 h de tratamiento hormonal, las células se incubaron con [metil-1 3H] timidina (Perkin Elmer, Courtaboeuf, Francia) durante 48 h o 20 h para células KBE o cancerosas, respectivamente a 37°C. Después de la incubación las células se lavaron dos veces con PBS 1X y una vez con de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Las células se incubaron en TCA al 5% durante 15 minutos a 4°C y se lisaron en NaOH 0,1 N durante 30 minutos a 37°C. El lisado celular total se añadió a 5 ml de líquido de centelleo Ecolite (MP biomedical, Illkirch, Francia) y la
- 55 radiactividad se contó con un contador β HIDEX 300SL (ScienceTec, Courtaboeuf, Francia).

Análisis de citometría de flujo

Después de 96 h o 48 h de tratamiento hormonal, respectivamente, para células HBE o MCF-7 y T-47D, las células se lavaron en PBS, la matriz se disoció con enzima acutasa (laboratorio PAA, Les Mureaux, Francia) y se centrifugó 5 minutos a 1.350 rpm. Las células se fijaron y congelaron a -20°C en etanol al 70%. Antes del análisis, las células se lavaron en PBS y se tiñeron con 10 µg/ml de yoduro de propidio en PBS (que contenía 0,835 U/ml de ribonucleasa A) (Sigma, St. Quentin Fallavier, Francia). Para cada muestra se contaron al menos 10 000 células en un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia). Después de suprimir los dobletes y los residuos, se analizó la distribución del ciclo utilizando el programa informático ModFit LT (Verity Software House, EE. UU.).

10 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en media \pm SEM. Para determinar la significación estadística de los tratamientos, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples ANOVA de una vía y Tukey-Kramer para comparar la eficiencia relativa de cada tratamiento con el programa informático InStat 3 (GraphPad, EE. UU.). Cuando solo se comparaban dos tratamientos, se realizó una prueba de la t para datos independientes. $p < 0,05$ se consideró como significativo.

15 Resultados

Efectos de UPA en la transactivación de genes PR

Para analizar las propiedades del antagonista de UPA en la transactivación génica inducida por PR, se transfectaron células epiteliales de mama humanas (HBE) normales y estirpe celular de cáncer de mama T-47D con el gen informador MMTV-Luc (Fig. 1). En las células HBE que expresaron cantidades bajas y variables de PR entre pacientes (Malet, *et al.*, 1991. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73 (1): 8-17), la progesterona (P) indujo una expresión de luciferasa significativa (inducción del pliegue de la referencia de $1,38 \pm 0,11$, $p < 0,05$) (Fig. 1 A). Para estudiar mejor los efectos de la dosis de UPA sobre PR, se cotransfectaron células HBE con plásmidos de expresión hPR-A y hPR-B (Fig. 1B). UPA y RU-486 (RU) inhibieron la transactivación de MMTV11 Luc inducida por P de una manera dependiente de la dosis de 1.000 a 10 nM. Las células HBE también se transfectaron con solo hPR-A o hPR-B, para discriminar las acciones de UPA entre las isoformas de PR. No se observó ninguna diferencia con el aumento de los niveles de cada isoforma de PR en el rendimiento del antagonista de UPA (Fig. 1 C, D). En la estirpe celular T-47D, UPA y RU mostraron acciones antagonistas de PR similares y potentes de 1.000 a 10 nM (Fig. 1 E). Se detectaron también respuestas parciales de antagonista a 1 nM (Fig. 1 E). Tanto en células HBE como en T-47D, UPA y RU no presentaron propiedades de agonista progestacional en la transcripción del gen indicador (Fig. 1 B-E). Estos resultados indicaron que UPA actuó como un potente antagonista de P en células de mama normales y cancerosas.

Actividad de UPA en la expresión de ARNm de genes diana de PR

La concentración más baja de UPA necesaria para ejercer una actividad antagonista completa en células HBE fue de 100 nM. Por lo tanto, esta concentración se eligió para seguir estudiando los efectos de UPA sobre genes diana P específicos en células HBE y T-47D. Se añadió estradiol (E2) a las células HBE para aumentar la expresión de PR tal como se describió anteriormente.

La ácido graso sintasa (FASN) está implicada en la diferenciación normal de las células mamarias, así como en la evolución del tumor mamario. Una regulación up3 del ARNm de FASN por progestinas a través de PR se demostró previamente en células de mama normales y tumorales *in vitro* e *in vivo*. Como se muestra en la figura 2 A, UPA fue capaz de evitar la inducción por P de la expresión de ARNm de FASN tanto en células HBE como en T-47D. Se observó que P disminuyó la expresión de ARNm de ciclina A en células de mama normales y en células T-47-D (Fig. 2B), como se señaló anteriormente en células de cáncer de mama MDA-MB-231 transfectadas por PR (Lin, *et al.*, 2003, *Endocrinology* 144 (12): 5650-5657). La UPA invirtió la disminución del ARNm de ciclina A inducida por P en HBE y T-47D (Fig. 2B). Se señaló anteriormente una disminución de la expresión de la proteína CLL/linfoma 2 de linfocitos B (BCL2) antiapoptóticos en el tratamiento con progestina en células de mama normales y tumorales (Kandouz, *et al.*, 1996, *Int. J. Cancer* 68 (1): 120-125; Gompel, *et al.*, 2000, *Steroids* 65 (10-11): 593-598). Como se muestra en la figura 2 C, se observó también una disminución de la expresión de ARNm de BCL2 por P en células HBE y T-47D.

Sin embargo, UPA no invirtió la disminución del ARNm de BCL2 inducida por P en células HBE, mientras que UPA antagonizó el efecto inhibitorio de P sobre este transcrito en células T-47D ($p < 0,01$) (Fig. 2C). La fosfatasa alcalina no específica del tejido (ALPL) es un gen sensible a P implicado en la metástasis del cáncer de mama. En T-47D, UPA inhibió totalmente la fuerte inducción mediada por P de la transcripción de ALPL (Fig. 2 D). En células HBE, la expresión de ARNm de ALPL no fue modificada por el tratamiento de P (datos no mostrados). UPA no mostró actividad agonista de PR en estos genes.

Efectos de UPA en la transactivación del gen GR

El estudio se realizó en células HBE y MCF-7, que expresaron altas cantidades de GR como se señaló anteriormente (Courtin, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res. Treat.*). Las células se transfectaron con un gen informador

GRE-Luc y se trataron con dexametasona (DEX), UPA y su metabolito mono-desmetilado proximal, CDB-3877 (CDB), que se sabe que ejercen menos actividad antiglucocorticoide que UPA (Attardi, *et al.*, 2004, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88 (3): 277-288). Se confirmó la actividad anti glucocorticoide reducida de este metabolito, ya que UPA inhibió en $41,3 \pm 5,8\%$ la transactivación de luciferasa inducida por DEX, mientras que su metabolito no pudo inhibir la actividad de DEX en células HBE ($18,1 \pm 11,8\%$) (Fig. 3 A). Sin embargo, en células MCF-7, tanto UPA como CDB antagonizaron significativamente en $59 \pm 3,4\%$ y $26,5 \pm 9,1$, respectivamente, la transactivación de luciferasa inducida por DEX (Fig. 3 B). Estos resultado sugieren una potencia glucocorticoide más fuerte de UPA en las células de cáncer de mama MCF-7 que en HBE.

Actividad de UPA en la expresión de ARNm de genes diana GR

Con el fin de definir mejor los efectos antiglucocorticoides UPA en células HBE y MCF-7, se analizaron expresiones de ARNm de diversos genes sensibles a glucocorticoides después del tratamiento con DEX y UPA. La respuesta 3 precoz inmediata (IEX-1) y el regulador de la señalización 2 de la proteína G (G0S8) han estado implicados en la supervivencia celular en condiciones de estrés y en la señalización de la proteína G, respectivamente. IEX-1 y G0S8 se caracterizaron como genes sensibles a los glucocorticoides. Como se muestra en la figura 4 A, la expresión de ARNm de IEX-1 fue reducida por DEX y UPA no antagonizó esta respuesta en células HBE y MCF-7. Por otra parte, UPA ejerció un ligero y no significativo efecto antagonista sobre el aumento inducido por DEX del ARNm de G0S8 en células HBE, mientras que su actividad antiglucocorticoide fue fuerte en células MCF-7 ($p < 0,001$) (Fig. 4 B). Se demostró previamente que los genes de ciclina A y BCL2 están regulados 1 por DEX *in vitro* en osteoblastos y neuroblastomas, respectivamente. Por lo tanto, las acciones de DEX y UPA se analizaron sobre la expresión de ARNm de ciclina A y BCL2 en células HBE y MCF-7. La ciclina A fue regulada diferencialmente por DEX en los dos tipos de células como expresión de ARNm se indujo en células HBE y se reprimió en células MCF-7 (Fig. 4C) (Courtin, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res. Treat.*). En ambos modelos celulares, UPA inhibió parcialmente el efecto DEX sobre la expresión de ARNm de ciclina A. El ARNm de BCL2 fue disminuido por DEX en HBE y en células MCF-7 (Fig. 4 D). Sin embargo, UPA no invirtió la disminución de DEX del ARNm de BCL2 en células HBE, mientras que antagonizó parcialmente este efecto en células MCF-7. El UPA no mostró actividad agonista glucocorticoide en estos genes (Fig. 4).

Acción de UPA en la proliferación y la apoptosis

P y glucocorticoides pueden inducir diferentes efectos proliferativos y de supervivencia en células de mama normales y tumorales. Con el fin de evaluar el papel de UPA en estos episodios celulares, la proliferación y la apoptosis se midieron respectivamente por incorporación de timidina tritiada (Fig. 5) y citometría de flujo (Fig. 6) en los tres modelos celulares. Los efectos de UPA en PR se estudiaron en HBE y T-47D, pero no en células MCF-7, porque previamente se demostró una falta de funcionalidad de PR en esta estirpe celular (Courtin, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res. Treat.*). Las acciones de UPA en GR solo se estudiaron en células HBE y MCF-7 ya que las células T-47D utilizadas en la presente memoria no expresan GR (Courtin, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res. Treat.*). En células HBE, UPA no inhibió el efecto antiproliferativo inducido por P (Fig. 5 A). En cambio, UPA inhibió la fuerte actividad proliferativa inducida por DEX (Fig. 5 A). En las células T-47D, UPA invirtió la actividad antiproliferativa de P (Fig. 5B). En las células MCF-7, UPA tendía a evitar los efectos antiproliferativos débiles de DEX (Fig. 5C). El tratamiento con UPA solo no tuvo efecto sobre la proliferación en ningún tipo de células (Fig. 5). La apoptosis se midió por cuantificación del porcentaje 1 de sub-G1 de células por análisis de citometría de flujo. P ejerció un efecto proapoptótico intenso en células HBE, en contraste con DEX que presentaba características antiapoptóticas (Fig. 6 A). Cuando se combina con UPA, ambas actividades hormonales se invirtieron. Asimismo, P aumentó el porcentaje de células sub-G1 y UPA tendió a inhibir este efecto en células T-47D (Fig. 6 B). En MCF-7, DEX mostró una capacidad proapoptótica que fue inhibida totalmente por UPA (Fig. 6 C). UPA no tenía propiedades apoptóticas ni de supervivencia por si misma, pero cotrarrestó la mayoría de los efectos de P y DEX en células HBE, T-47D y MCF-7.

Ejemplo 2: Impacto de UPA en un modelo experimental *in vivo*, con tejidos de mama humanos normales xenotrasplantados en los ratones lampiños

Materiales y métodos

Pacientes

Se obtuvieron muestras de tejidos de mama de 6 mujeres (de 29 a 42 años) sometidas a cirugía para mamoplastia de reducción, con su consentimiento informado según la ley francesa de experimentación clínica. Los pacientes no tenían antecedentes de enfermedad mamaria y los estudios inmunohistoquímicos que incluían una tinción con hematoxilina-floxina-azafrán (HPS) solo mostraban tejido mamario normal.

Xenotrasplantes de mama humana en ratones y tratamientos con gránulos

Se adquirieron ratones atómicos NMRInu/nu 20 hembra ovariectomizadas de cuatro semanas de edad del laboratorio Janvier (Le Genest Saint Isle, Francia). Se obtuvieron muestras de tejidos de mama de 6 mujeres (de 29 a 42 años). Tejido de la glándula mamaria humana se cortó en fragmentos de $2 \times 2 \times 2$ mm y 4 fragmentos se xenotrasplantaron por vía subcutánea en el lomo de 4 ratones por grupo. Se realizaron cuatro grupos de tratamiento:

referencia, E2, E2+P y E2+P+UPA. Los tratamientos se administraron injertando gránulos de esteroides en el cuello de cada ratón. Las condiciones experimentales se determinaron inicialmente usando un intervalo de dosis de hormonas mezcladas con colesterol en los gránulos. Los análisis de muestras de sangre se realizaron después de 2 semanas y 4 semanas de tratamiento para medir las concentraciones hormonales plasmáticas. Por último, se utilizó la dosis de 0,3 mg para E2 y 20 mg para P y UPA, ya que proporciona las concentraciones sanguíneas esperadas. Para los grupos de referencia, se usaron gránulos que contenían solo colesterol. Para reproducir las condiciones del ciclo menstrual, se injertaron ratones el primer día de experimento con colesterol, E2 y/o UPA que contenía gránulos y a los catorce días colesterol o gránulos que contenían progesterona en grupos de referencia y E2, o en los grupos E+P y E2+P+UPA, respectivamente. Veintiocho días después del inicio del experimento, se sacrificaron los ratones. Se extrajo sangre de cada ratón, y el suero se congeló a -20°C hasta que las concentraciones de la hormona

Análisis

Se recogieron fragmentos de tejido mamario y se fijaron inmediatamente en solución de paraformaldehído para análisis inmunohistoquímico. Todos los protocolos de estudio y las condiciones ambientales de los bioterios fueron aprobados por el comité de ética francés para el cuidado y uso de animales de laboratorio Charles Darwin.

Análisis de concentración hormonal

El estradiol se midió por radioinmunoanálisis usando Clinical Assays Estradiol-2 (Sorin Biomedica Diagnostics SpA, Saluggia, Italia). Se evaluaron las concentraciones de progesterona por UPLC-MSMS usando Acquity UPLC y Quattro Premier XE (Waters, Milford Mass., EE. UU.).

Las concentraciones de UPA se midieron usando la técnica LC-MS/MS por MPI Research (State College, Pa., EE. UU.).

Análisis inmunohistoquímico

El índice mitótico se calculó usando el anticuerpo Ki67, y se determinó para cada tejido mamario trasplantado en ratones. Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron utilizando la estación de trabajo BOND-MAX (Leica, Nanterre, Francia). Las secciones de parafina de los xenotrasplantes de tejido mamario se desparafinaron y rehidrataron antes de la recuperación de antígeno usando solución de recuperación de citrato (pH 6,0) para anticuerpo Ki67 o solución de recuperación de EDTA (pH 9,0) para anticuerpos PR y ERalfa, durante 30 min. Las secciones se incubaron a continuación con anticuerpos monoclonales Ki67 a 1:100 (Novocastra, NCL5 L-Ki67-MM1), PR a 1:80 (Biogenex, MU-328-UC) o ER a 1:300 (Novocastra, NCL-L6 ER-6F11). Para la detección de señales, se usó el Kit Bond Polymer Refire Detection. Se adquirieron reactivos de Menarini-Diagnostic (Rungis, Francia). Se incluyó en cada conjunto una referencia negativa (omitiendo el primer anticuerpo). Para cada marcador, se llevó a cabo la determinación de la proporción de células positivas en un total de 1.000 células lumbales lobulares y 1.000 canaliculares en los 4 fragmentos de tejido mamario trasplantados en cada ratón. Para cada experimento, los porcentajes finales para cada tratamiento fueron la media de los porcentajes obtenidos en los cuatro ratones por grupo.

Resultados

Acción de UPA en la proliferación de tejido mamario

Los inventores desarrollaron un modelo *in vivo* para estudiar el UPA en la administración a largo plazo en el tejido mamario. Muestras de tejidos de mama normales humanos se xenotrasplantaron en ratones atímicos tratados con E2, o E2+P, o E2+ P+UPA, o colesterol (referencia) (ver procedimiento experimental). Con el fin de reproducir la cronología de las secreciones de E2 y P que se producen en el ciclo menstrual femenino humano, se injertaron gránulos de E2 al comienzo del experimento, mientras que gránulos de P se injertaron al decimocuarto día. Los gránulos de UPA se injertaron al comienzo del experimento para simular un tratamiento crónico. Se midieron las concentraciones de E2, P y UPA en suero de ratones para validar el método de tratamiento. La concentración media de E2 en el suero de los ratones fue de $36,88 \pm 4,25$ pg/ml (media \pm SEM) correspondiente al intervalo bajo de las concentraciones fisiológicas de E2 descrito en la fase folicular. La concentración de P fue de $13,05 \pm 1,14$ ng/ml (media \pm SEM) de forma equivalente a las concentraciones plasmáticas medias de P en mujeres durante la fase luteínica media. La concentración de UPA fue de $63,49 \pm 10,46$ ng/ml (media \pm SEM) en el mismo intervalo que se observó en el uso clínico. Las concentraciones hormonales fueron indetectables en los ratones de referencia (E2 < 0,8 pg/ml, P < 0,4 ng/ml, UPA < 0,5 ng/ml). Como se muestra en la Fig. 7 A, el receptor de estradiol (ER) y las expresiones de PR se mantuvieron en los fragmentos de mama trasplantados tratados al final del experimento en comparación con el tejido mamario original antes de los trasplantes. Se analizó el marcador de expresión mitótico Ki67 para determinar la actividad proliferativa del tejido mamario en los lóbulos glandulares y los conductos según el tratamiento (Fig. 7 B, C). En el grupo de referencia de los tejidos trasplantados, la tasa de células mitóticas fue baja y homogénea, a $1,7 \pm 0,4\%$ en los lóbulos y $1,8 \pm 0,6\%$ en los conductos. La actividad proliferativa aumentó ligeramente pero no significativamente en los lóbulos del grupo tratado con E2 en comparación con el grupo de referencia (Fig. 7 B, C). Sin embargo, en los conductos, el índice mitótico fue significativamente elevado en el grupo tratado con E2 ($3,1 \pm 0,7$ veces la inducción en comparación con el grupo de referencia, $p < 0,05$). No se observaron

diferencias significativas en los grupos E2+P y E2+P+UPA en comparación con el tratamiento E2 en las estructuras lobular y canalicular (Fig. 7 B, C). Estos resultados sugieren fuertemente que la actividad proliferativa en el tejido mamario está mediada predominantemente por E2. También se demuestra que UPA no influye significativamente en la tasa de proliferación de células de mama epiteliales normales.

5 Ejemplo 3: Impacto de UPA en tejidos de mama humano BRCA1 xenotrasplantados en ratones lampiños

Materiales y métodos

Se obtuvieron muestras de tejido mamario mutado de 5 mujeres (36-57 años) portadoras de mutaciones de BRCA1.

10 Se realizaron xenotrasplantes como se describió anteriormente (Ejemplo 2). Normalmente, se trasplantaron en el mismo ratón 4 fragmentos de tejido mamario de una paciente que no portaba mutaciones de BRCA1 y 4 fragmentos de mama de un paciente que portaba mutaciones de BRCA1, en la parte izquierda y derecha de la columna, respectivamente. Se formaron los mismos grupos.

Resultados

15 Los inventores usaron el mismo modelo que el descrito en el apartado anterior para investigar los efectos de las hormonas sobre la proliferación del tejido mamario humano recogido en pacientes portadoras de mutaciones de BRCA1. Se observó una mayor variabilidad con respecto a la expresión de ERD en las estructuras tanto lobulares como canaliculares de pacientes con mutaciones de BRCA1 antes de trasplantarse. El nivel de expresión basal de PR era más bajo en pacientes portadoras de la mutación de BRCA1 en comparación con pacientes con un alelo natural en las estructuras lobulares. Por el contrario, el estado BRCA1 no tuvo impacto en el nivel de expresión de PR en las estructuras canaliculares. La medida del estado proliferativo mediante la expresión de Ki67 fue mayor en
20 las células lobulares de los pacientes con BRCA1, pero menor en las células canaliculares, en comparación con los pacientes de referencia.

Después del trasplante, pero en ausencia de tratamiento, no se observó una modificación estadística significativa de la expresión de ERD, mientras que el nivel de expresión de PR tanto en estructuras lobulares como canaliculares tendía a ser incluso más bajo que antes del trasplante. En ambas estructuras, la ausencia de estimulación hormonal produjo una disminución de la proliferación.
25

28 días de tratamiento con E2, P, E2+P o E2+P+UPA no dieron como resultado una variación significativa del nivel de expresión de ER α . Se observaron tendencias hacia el aumento de la expresión de PR en fragmentos de mama trasplantados en ratones que recibieron E2 o E2+P o E2+P+UPA. Este aumento se observó más particularmente en las estructuras lobulares de 3 pacientes portadoras de la mutación BRCA1.

30 En cada caso donde la proliferación fue estimulada por la combinación del tratamiento con E2+P, UPA mostró actividad antiproliferativa (véanse las figuras 8 y 9).

Ejemplo 4

Impacto de UPA sobre el crecimiento del tumor de mama humano trasplantado en ratones lampiños

Material y métodos

35 El modelo de xenotrasplante utilizado en este estudio fue HBCx-34. HBCx-34 es un carcinoma canalicular mamario con P53 natural, sin sobreexpresión de HER2 y sobreexpresión de PR y ER α . El tumor es muy sensible a la adriamicina/ciclofosfamida y responde a docetaxel y capecitabina. HBCx-34 no tiene propiedad caquéctica.

Inducción del modelo Tumorgraft: Procedimientos de pretratamiento

40 Tumores HBCx-34 (P14.0.0/2) se trasplantaron por vía subcutánea en 5-10 ratones (ratones donantes, pases (n-1), ratones hembra atímicos lampiños (Hsd: Athymic Nude-Fox1nu), de 6 a 9 semanas, Harlan Laboratories (Gannat, Francia)). Cuando estos tumores alcanzaron de 1.000 a .2000 mm³ (entre 60 y 78 días), los ratones donantes se sacrificaron por dislocación cervical, los tumores se extirparon asépticamente y se disecaron. Después de eliminar las áreas necróticas, los tumores se cortaron en fragmentos de aproximadamente 20 mm³ y se transfirieron durante
45 10 minutos como máximo en medio de cultivo DMEM/F12 estéril, sin ningún componente adicional, antes del trasplante.

Se incluyeron en el estudio ratones sanos de 6 a 9 semanas y que pesaban al menos 20 g. Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina, y luego se aseptizó la piel con una solución de clorhexidina, se hizo una incisión en la región interescapular y se colocó un fragmento tumoral de 20 mm³ en el tejido subcutáneo. Se cerró la piel con grapas.
50

Inducción del modelo Tumorigraft: Fase de tratamiento

5 Se asignaron ratones a diferentes grupos según su volumen tumoral para dar un volumen tumoral medio y mediano homogéneo en cada brazo de tratamiento. Diez ratones/grupo, con HBCx-34 tumores entre 75 y 144 mm³, se asignaron al azar según su volumen tumoral en grupos experimentales, y se iniciaron los tratamientos (UPA 130 mg/kg, p. o. o vehículo de referencia) 33 días después de la implantación del tumor por una duración total de 42 días.

Análisis

10 Se observó el aspecto físico, comportamiento y cambios clínicos de los ratones. Los animales se pesaron quincenalmente durante todo el período experimental. La toxicidad de los diferentes tratamientos se determinó como pérdida de peso corporal.

El volumen tumoral se evaluó quincenalmente durante todo el período experimental. Los tumores se recogieron al final del tratamiento, se pesaron y se procesaron para su análisis.

Resultados

15 El tratamiento con UPA fue bien tolerado y no se registró pérdida significativa de peso corporal durante el estudio. No se comunicó ninguna observación clínica relacionada con el tratamiento durante el período experimental.

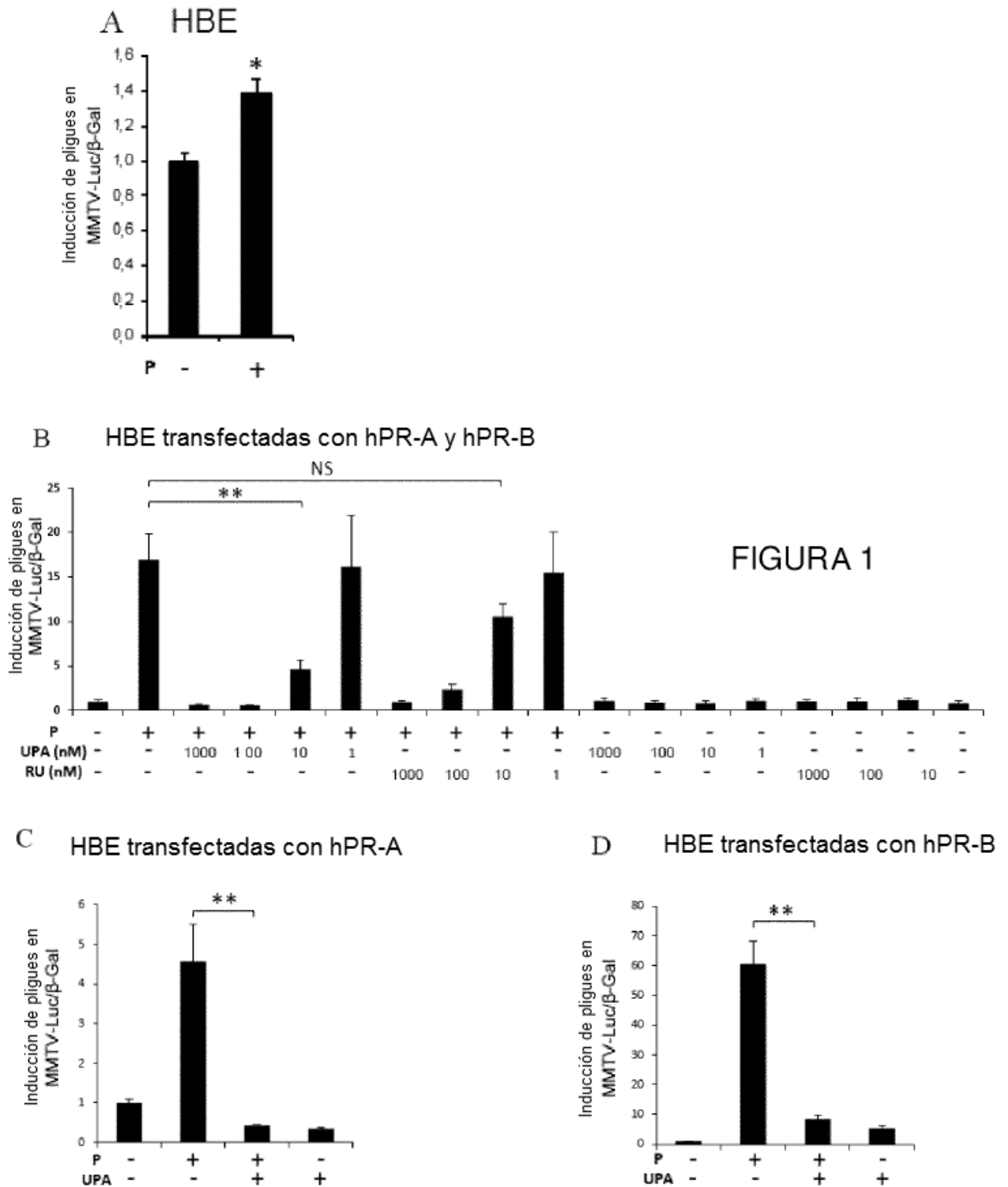
Los volúmenes tumorales medios (TV) al inicio del tratamiento fueron de 112,2 ± 7,1 y 102,4 ± 7,7 mm³ en los grupos de referencia y tratados con UPA, respectivamente.

Al final del tratamiento, se midió un aumento de 4,63 veces en el volumen tumoral en el grupo de referencia, con un volumen tumoral medio de 625,0 ± 108,6 mm³.

20 UPA ejerció una actividad antitumoral; el TV medio aumentó 2,17 veces en los ratones tratados UPA (media TV en el sacrificio: 332,0 ± 61,0 mm³). La proporción de TV en el grupo tratado frente al de referencia (T/C) fue del 53%.

REIVINDICACIONES

1. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama en un paciente.
- 5 2. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según la reivindicación 1, en donde el paciente porta una mutación en el gen BRCA1 y/o BRCA2.
3. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención de un tumor de mama según la reivindicación 1, en donde el paciente porta una mutación en el gen BRCA1 y/o BRCA2.
- 10 4. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en el tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tumor de mama es un carcinoma de mama.
5. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el acetato de ulipristal, o dicho metabolito es para ser administrado por vía oral.
- 15 6. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el acetato de ulipristal, o dicho metabolito es para ser administrado por vía intravenosa.
- 20 7. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el acetato de ulipristal, o dicho metabolito es para ser administrado por vía vaginal o intrauterina.
8. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el paciente es un paciente femenino.
- 25 9. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tumor de mama es un carcinoma.
- 30 10. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención o tratamiento de un tumor de mama según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tumor de mama es un tumor benigno.
11. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183 según la reivindicación 1, en donde el metabolito es CDB-2914 monodesmetilado (CDB-3877).
- 35 12. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención de un tumor de mama según la reivindicación 1, en donde la paciente además necesita anticoncepción.
- 40 13. Acetato de ulipristal, o uno de sus metabolitos seleccionado del grupo consistente en CDB-3877, CDB-3963, CDB-3236 y CDB-4183, para su uso en la prevención de un tumor de mama según la reivindicación 1, en donde el acetato de ulipristal o dicho metabolito proporciona además anticoncepción regular en la paciente.



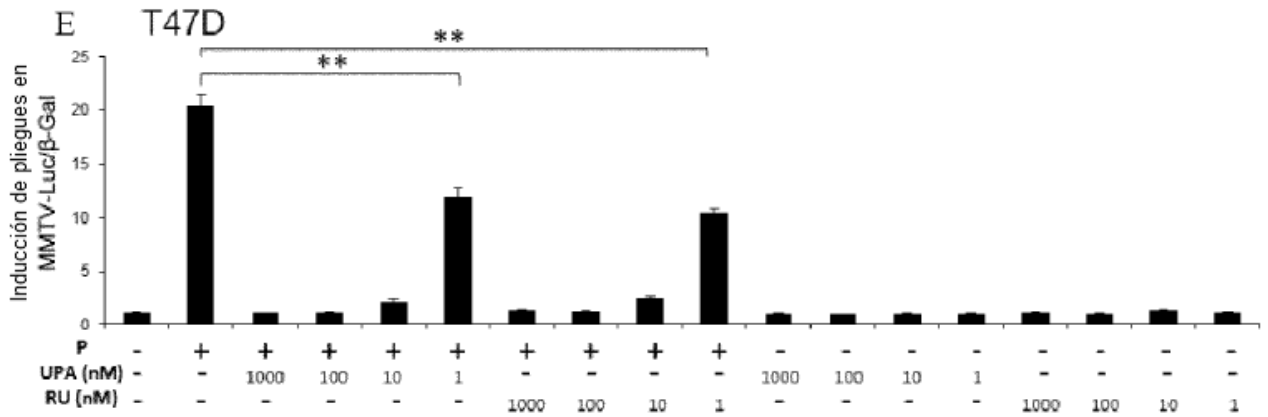
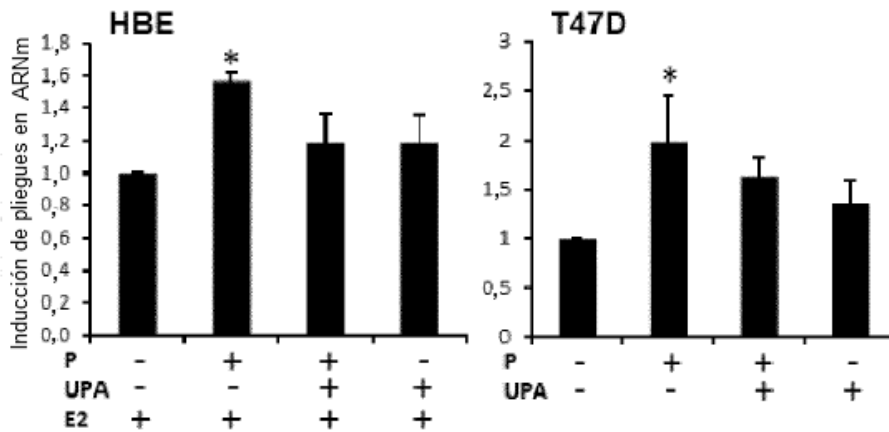


FIGURA 1 cont

A FASN



B ciclina A

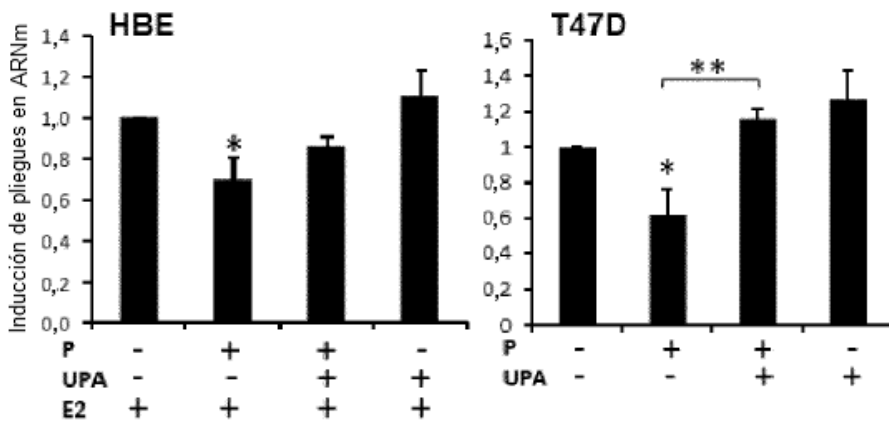


Figura 2

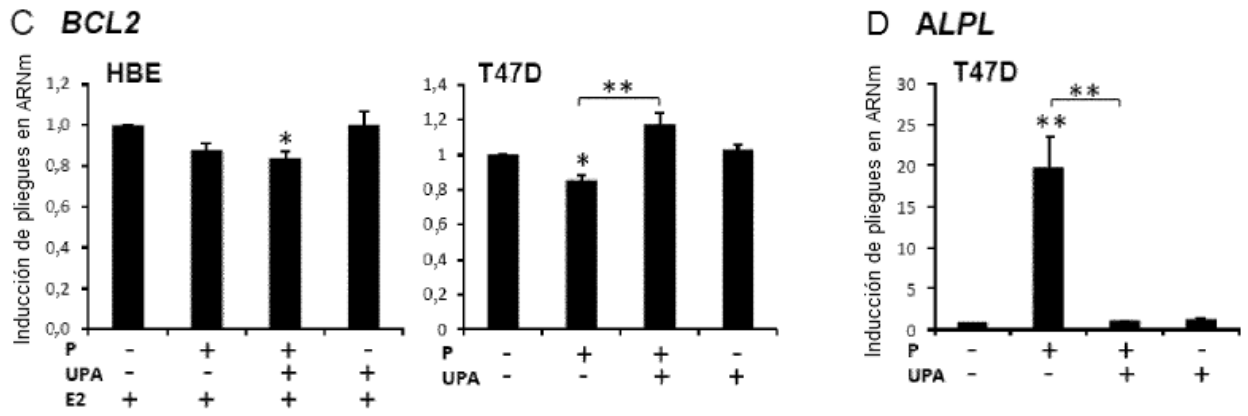


FIGURA 2 cont

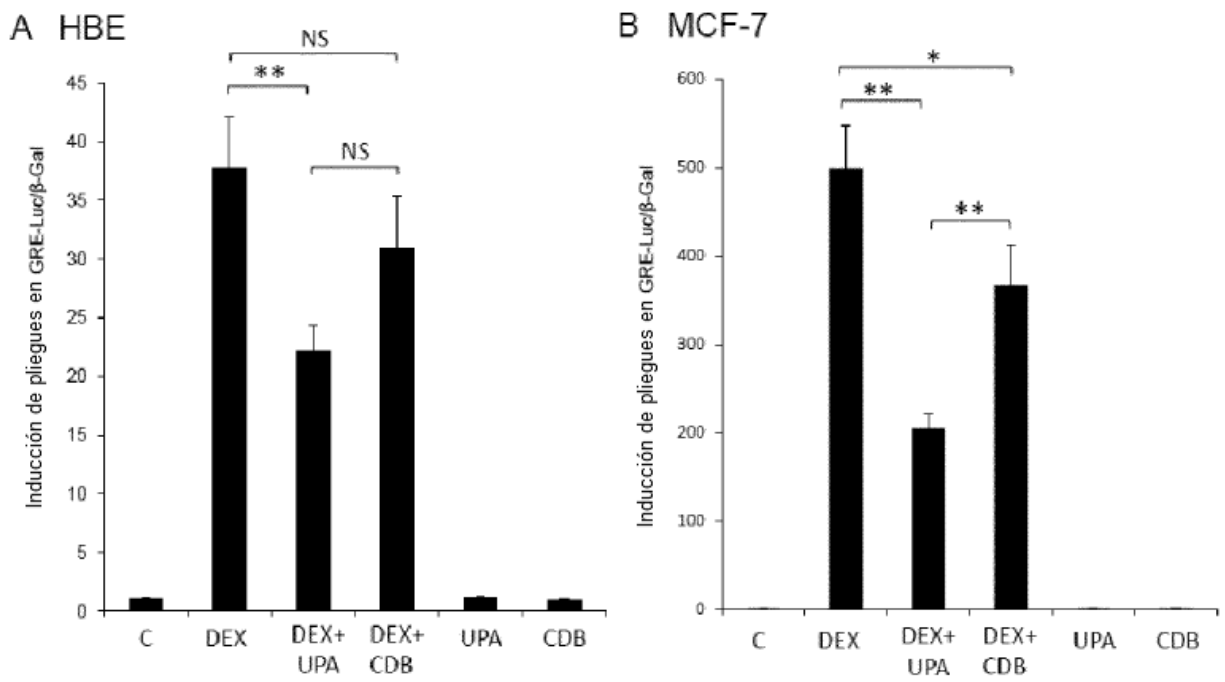


Figura 3

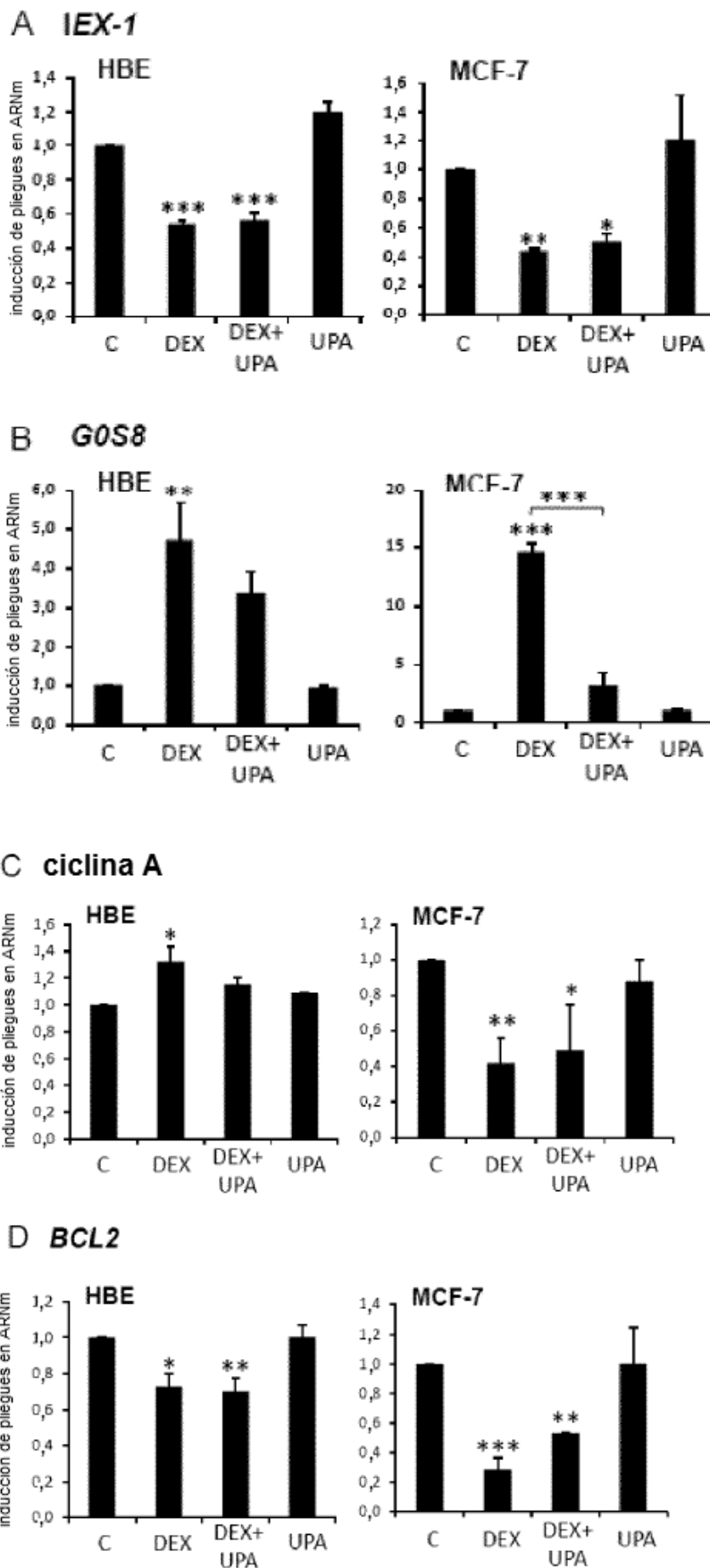


Figura 4

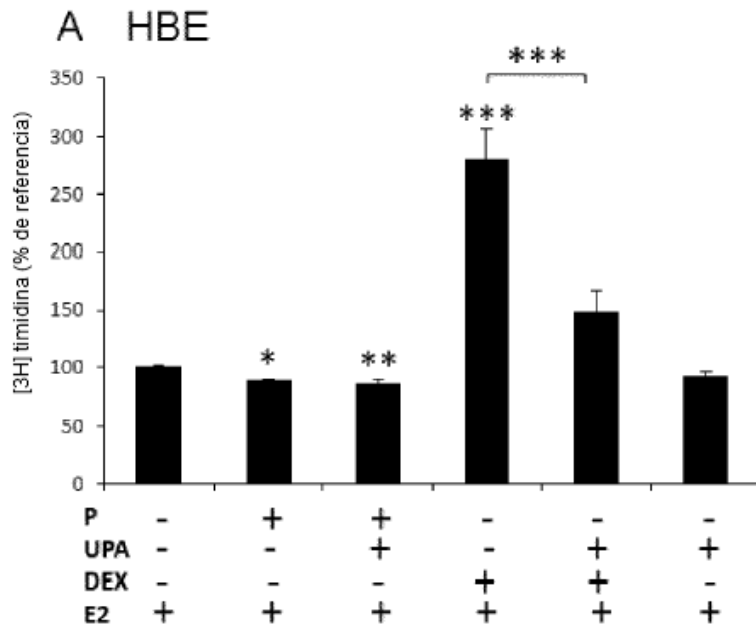
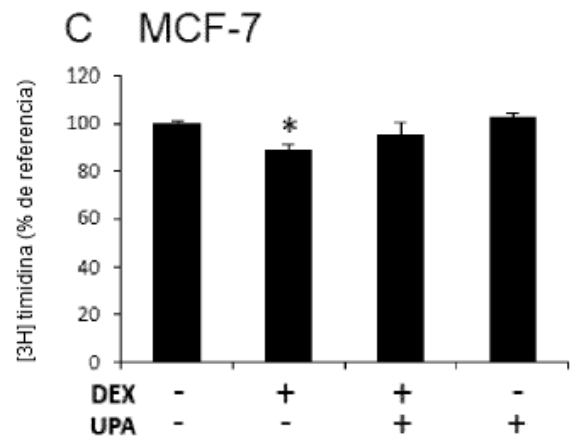
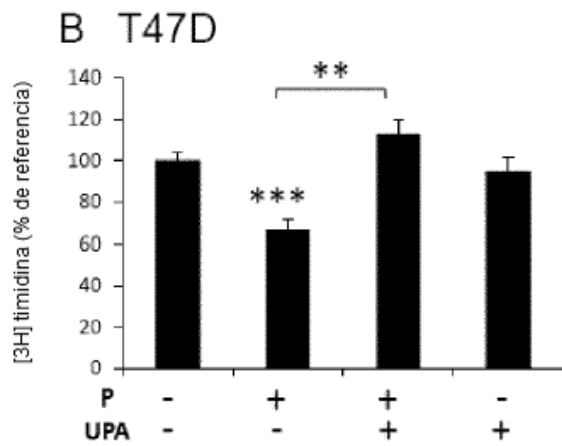


Figura 5



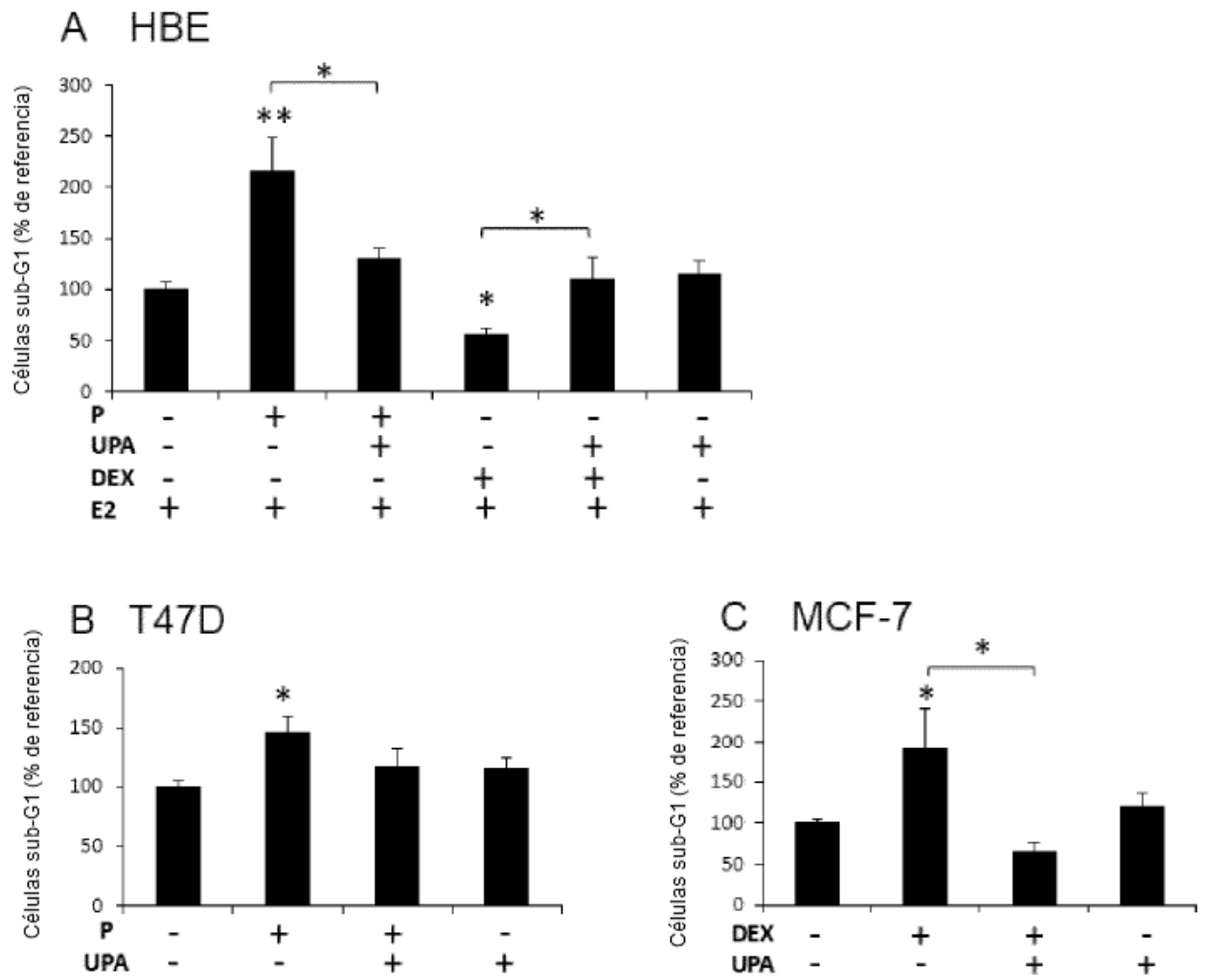
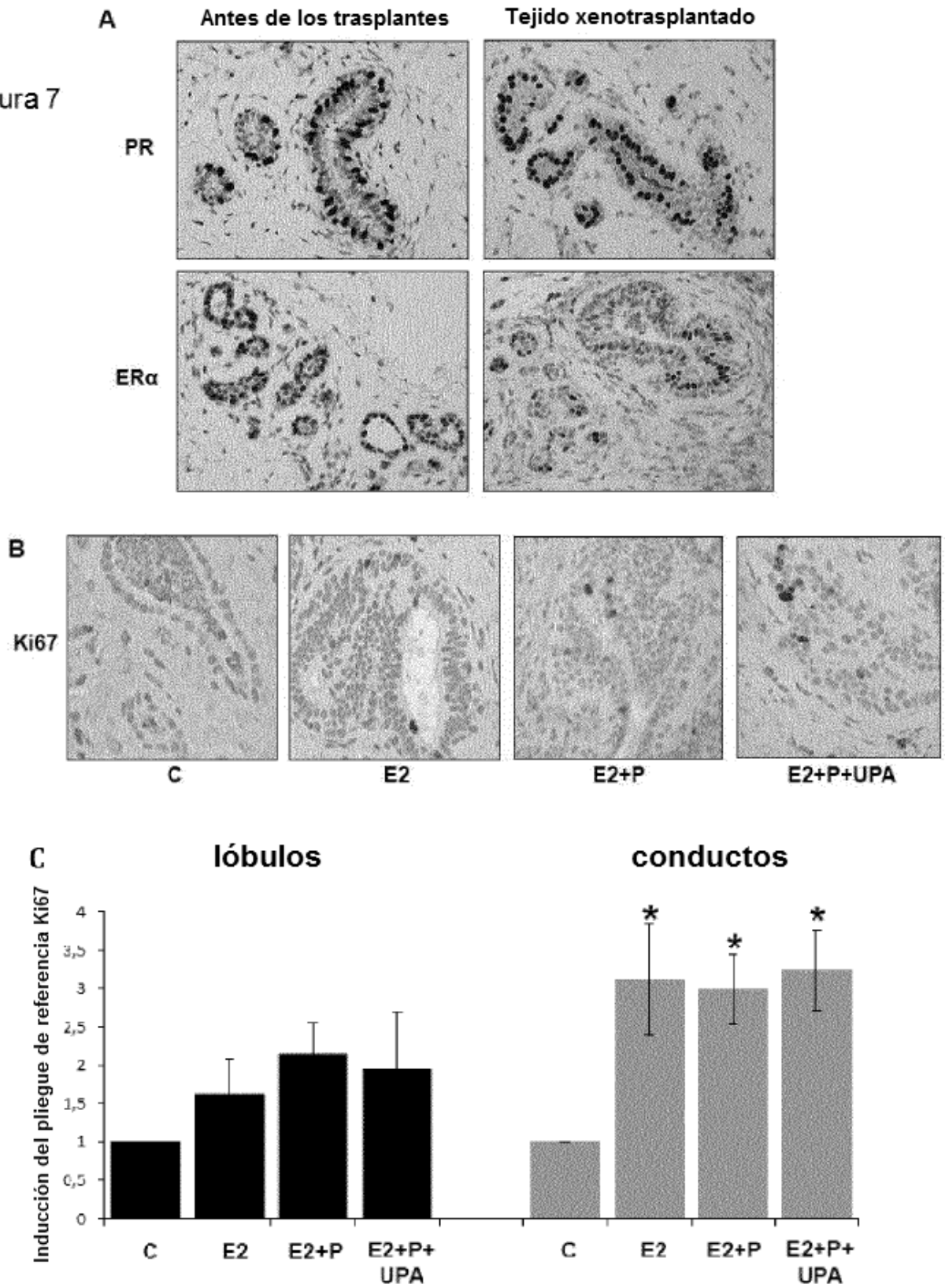


Figura 6

Figura 7



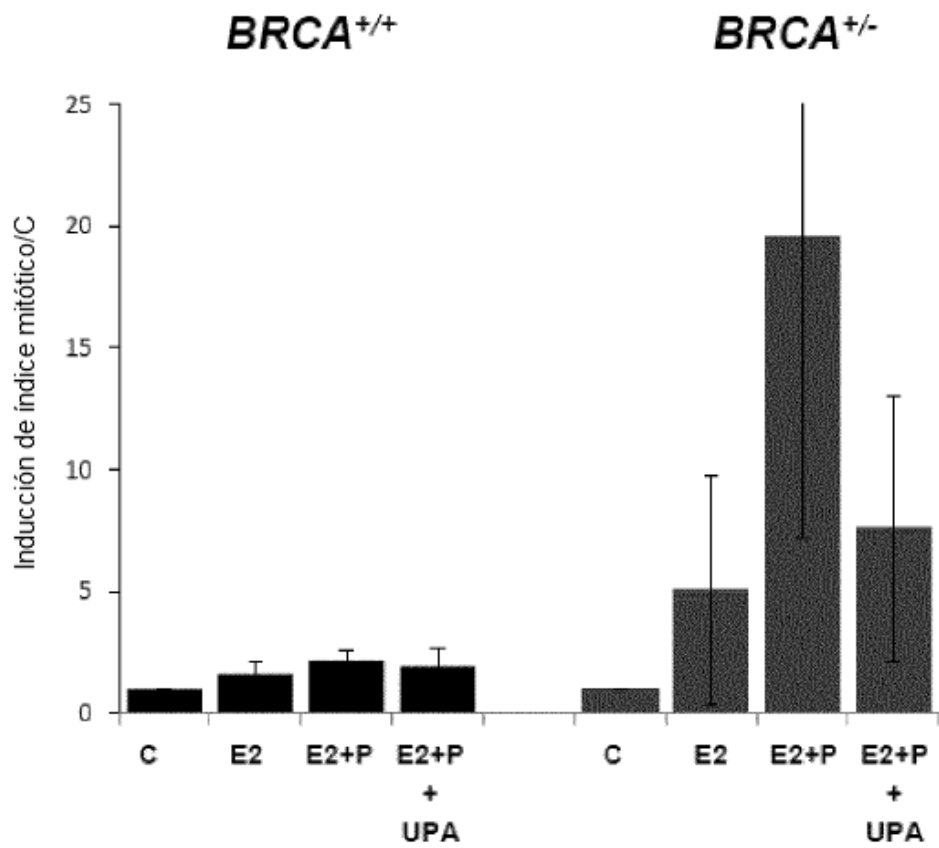


FIGURA 8

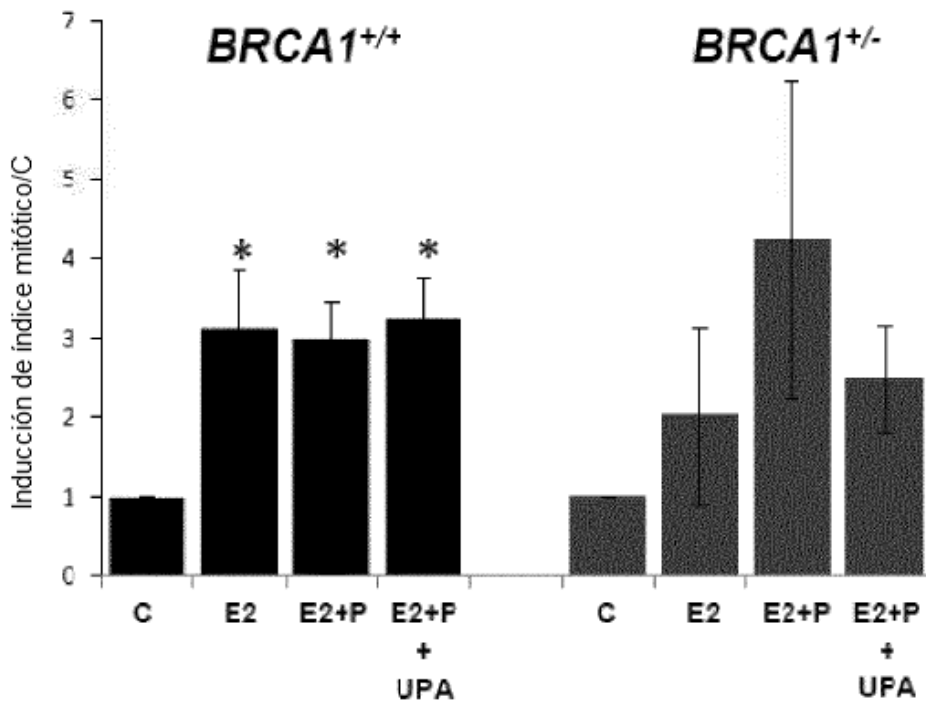


FIGURA 9