

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 543**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/201** (2006.01)

**A61K 38/38** (2006.01)

**A61K 35/20** (2006.01)

**A61K 47/12** (2006.01)

**A23L 33/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2013 PCT/GB2013/052132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2013 E 13762204 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2882446**

54 Título: **Terapia profiláctica y nutracéutica**

30 Prioridad:

**09.08.2012 GB 201214234**

**09.08.2012 GB 201214237**

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

**20.07.2018**

73 Titular/es:

**HAMLET PHARMA AB (100.0%)**

**BMC D10, Klinikgatan 32**

**222 42 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**SVANBORG, CATHARINA;**

**PUTHIA, MANOJ y**

**HO, CHIN SHING**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 676 543 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

## Terapia profiláctica y nutracéutica

La presente invención se refiere a terapia profiláctica en particular para la prevención de cáncer del tracto gastrointestinal y en particular cáncer de colon. Los tratamientos pueden efectuarse usando un régimen nutracéutico y también se describen y reivindican novedosas composiciones nutracéuticas. Estas composiciones pueden usarse en particular para la prevención pero también para el tratamiento terapéutico de enfermedades proliferativas tales como cáncer, así como teniendo aplicaciones antibacterianas y antivíricas. Los procedimientos para preparar estas composiciones y su uso en terapia incluyen profilaxis y como productos nutracéuticos de aspectos adicionales de la invención.

Los cánceres de colon se mantienen como un desafío terapéutico mayor y el cáncer de colon es una de las causas principales de muertes relacionadas con cáncer. Mientras que la tasa de supervivencia de 5 años es extremadamente favorable después de la detección temprana y el tratamiento de tumores localizados, la mayoría de cánceres colorrectales están bien local o distalmente invasivos en el momento del diagnóstico, limitando las opciones de tratamiento y disminuyendo la supervivencia. Más del 80 % de todos los tumores colorrectales esporádicos y hereditarios muestran una pérdida de función APC (adenopoliposis colónica), debido a menudo a mutaciones truncadas en el gen (Vogelstein, y col. (1988) N Engl J Med 319: 525-532). La APC actúa como un supresor de tumores funcionando como una proteína de anclaje junto con la Axina para la caseína quinasa 1 (CK1) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), que fosforilan la expresión génica dependiente de  $\beta$ -catenina, incluyendo genes como Ciclina D1, VEGF y Cox-2 (Bienz My col. (2000) Cell 103: 311-320). Con el tiempo, los tumores acumulan mutaciones adicionales, afectando por ejemplo a KRAS y genes apoptóticos como p53 (Vogelstein y col anteriormente). Sin embargo, la mutación puntual de APC es suficiente para la iniciación del tumor y en ratones que llevan el alelo  $Apc^{Min/+}$  con una mutación puntual sin sentido en el nucleótido 2549 desarrollan espontáneamente múltiples adenomas intestinales y por lo tanto se han usado extensamente como un modelo de adenopoliposis colónica familiar y cáncer colorrectal humano (Moser AR y col (1990) Science 247: 322-324).

HAMLET (alfa-lactalbúmina humana hecha letal a células tumorales, siglas en inglés de *human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells*) es el primer miembro de una nueva familia de complejos proteína-lípido sin plegar tumorizadas, que consisten en  $\alpha$ -lactalbúmina parcialmente sin plegar y ácido oleico. Se aisló inicialmente en forma de una fracción obtenida pasando una fracción que contiene caseína de leche humana por una columna de intercambio iónico en condiciones de alta sal (documento WO96/004929), se descubrió ser biológicamente activa y en particular tenía una actividad antibacteriana. Posteriormente, han derivado otros procedimientos para preparar complejos activos incluyendo procedimientos en los que se calientan juntos en solución  $\alpha$ -lactalbúmina de diversas fuentes y ácido oleico. Sin embargo además, se ha descubierto que HAMLET y complejos relacionados tales como BAMLET, derivados de alfa-lactalbúmina bovina, matan células transformadas tales como células tumorales o células de papiloma, así como que tienen actividad antivírica. HAMLET mata muchos tipos de células tumorales *in vitro* y su actividad tumoricida se mantiene *in vivo*, como se muestra en modelos animales de xenoinjertos de glioblastoma y cáncer de vejiga así como en estudios clínicos. La aplicación tópica de HAMLET retiró o redujo los papilomas de piel y las instilaciones locales de HAMLET mataron células de cáncer de vejiga pero no las células sanas en los tejidos circundantes y provocaron una reducción en el tamaño del tumor. La sensibilidad de las células tumorales a HAMLET refleja la transformación oncogénica y se modifica por el estado glucolítico de la célula (Storm P, y col. (2011). Oncogene) El silenciamiento del ARNhp de los miembros de la ruta c-Myc o Ras confirió resistencia a HAMLET y el nivel de expresión de c-Myc fue paralelo a la sensibilidad de HAMLET. Adicionalmente, la privación de glucosa sensibilizó las células tumorales a HAMLET y la sensibilidad de HAMLET se modificó por enzimas glucolíticas dirigidas a ARNhp. Adicionalmente, se mostró que HAMLET tiene efectos pronunciados en el metabolismo global con una parálisis metabólica rápida en las células tumorales y desviación potencial del flujo glucolítico hacia la ruta de las pentosas fosfato.

Se consideró por los solicitantes abordar si HAMLET u otras entidades terapéuticas podrían usarse para terapia de cáncer de colon. Los constituyentes de HAMLET están presentes en la leche humana, donde el complejo se forma después del desplegamiento de la proteína y la hidrólisis del ácido oleico de los triglicéridos de la leche. A pH bajo, HAMLET puede ensamblarse, para pasar a través del tracto gastrointestinal del niño alimentado con pecho. Los estudios *in vitro* han demostrado que HAMLET es resistente a proteasa, sugiriendo que sobreviviendo al ambiente gastrointestinal HAMLET puede alcanzar y matar las células que son sensibles a sus efectos, incluyendo progenitores del cáncer de colon. Los solicitantes investigaron si HAMLET actúa como un producto terapéutico de cáncer de colon, usando la administración por vía oral en el modelo de ratón  $APC^{min}$ .

En vista del desarrollo del tumor paso a paso, teniendo lugar en este modelo, los solicitantes también exploraron si HAMLET actúa profilácticamente en ratones genéticamente susceptibles. Los resultados demuestran claramente los efectos profilácticos así como los terapéuticos de HAMLET, así como las dianas en la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.

Aunque el uso de complejos tales como HAMLET se ha demostrado previamente ser terapéutico en el tratamiento de un abanico de cánceres pre-existentes incluyendo cánceres mucosos (documento WO2005/082406) y para el tratamiento profiláctico de infección bacteriana, no se ha mostrado previamente que sea útil en la prevención de

cáncer. De esta manera este descubrimiento abre un nuevo enfoque par la profilaxis de enfermedades proliferativas.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un complejo biológicamente activo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de una alfa lactalbúmina de origen natural o una variante de la misma, en la que los restos de cisteína en la alfa lactalbúmina nativa son cambios a otros restos; o un péptido de hasta 50 aminoácidos derivados de dicho polipéptido y que comprenden Alfa 1 (restos 1-40) o Alfa 2 (restos 81-123) de la alfa-lactalbúmina humana, siendo de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; KQFTKXELSQLLKDIDYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 3) LDDITDDIMXAKKILDIKIDYWLAHKALXTEKLEQWLXEKL (SEQ ID NO 4) donde X es un resto de aminoácido distinto de cisteína;

y un ácido graso o lípido o una sal de los mismos, para su uso en el tratamiento profiláctico de cáncer del tracto gastrointestinal.

Este descubrimiento significa que los complejos pueden usarse en la prevención de cánceres y en particular cáncer de colon. Puede usarse en cualquier individuo pero pueden encontrar utilidad particular en individuos quienes tengan una predisposición genética al cáncer de colon, en particular como resultado de una mutación tal como la truncación del gen APC.

El complejo puede administrarse bien en forma de un producto farmacéutico, en cuyo caso el complejo se proporciona en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o bien alternativamente, el complejo puede combinarse con un producto alimenticio, tales como un producto lácteo tal como un yogur para su uso como un producto nutracéutico. Las composiciones de este tipo forman un aspecto adicional de la invención.

El complejo o la composición que lo contiene se administra adecuadamente por vía oral de tal manera que pueda acceder directamente al tracto gastrointestinal.

En una realización particular, el polipéptido presente en el complejo puede tener la secuencia de una  $\alpha$ -lactalbúmina o una variante de la misma como se describe anteriormente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "biológicamente activo" significa que el complejo tiene una actividad biológica, que es diferente de - o más fuerte que los componentes individuales. En particular, el complejo es capaz de inducir la muerte celular en particular selectivamente en células tumorales y/o tiene un efecto bactericida o antivírico no visto con la proteína nativa incluyendo por ejemplo formas de  $\alpha$ -lactalbúmina monomérica, aunque pueden estar disponibles otros efectos terapéuticos.

Los péptidos adecuados para su uso en el complejo de la invención son como se define anteriormente.

En una realización particular, se proporciona un complejo biológicamente activo que comprende un péptido de no más de 50 aminoácidos como se define anteriormente y una sal de un ácido graso o un lípido farmacéuticamente aceptable del mismo.

El péptido no tiene más de 50 aminoácidos. Dichos complejos son más fáciles de preparar y los materiales de partida son menos costosos. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse usando procedimientos convencionales para la producción de péptidos. Los complejos formados pueden ser más fáciles de manejar y formular para su administración, debido al peso molecular más pequeño.

El péptido adecuadamente no contiene elementos que den lugar al plegamiento y por lo tanto carece adecuadamente de aminoácidos que den lugar a uniones intramoleculares tales como restos de cisteína. En particular, cuando el péptido deriva de una proteína de origen natural, cualquier resto de cisteína se reemplaza por otros aminoácidos tales como alanina.

De esta manera en una realización particular, el complejo comprende el péptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 KQFTKXELSQLLKDIDYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 3) LDDITDDIMXAKKILDIKIDYWLAHKALXTEKLEQWLXEKL (SEQ ID NO 4) donde X es un resto de aminoácido distinto de cisteína.

Un ejemplo particular de dichas secuencias son aquellas de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. KQFTKAELSQLLKDIDYGGIALPELIATMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO: 5) LDDITDDIMAANKILDIKIDYWLAHKALATEKLEQWLAEKL (SEQ ID NO: 6).

La expresión "variante" se refiere a proteínas o polipéptidos que tienen una función biológica similar pero que la secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia base de la que deriva en que uno o más aminoácidos dentro de la secuencia se sustituyen por otros aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden considerarse como "conservativas" cuando un aminoácido se reemplaza por un aminoácido diferente con propiedades ampliamente similares. Las sustituciones no conservativas son cuando los aminoácidos se reemplazan con aminoácidos de un tipo diferente.

## ES 2 676 543 T3

Por “sustitución conservativa” se entiende la sustitución de un resto de aminoácido con otro resto de aminoácido de la misma clase, en la que las clases se definen como sigue:

Clase	Ejemplos de aminoácidos
No polar:	A, V, L, I, P, M, F, W
Polar cargado:	G, S, T, C, Y, N, Q
Ácido:	D, E
Básico	K, R, H.

5 Como es bien conocido por aquellos expertos en la materia, alterar la estructura primaria de un péptido por una sustitución conservativa puede no alterar significativamente la actividad de ese péptido debido a que la cadena lateral del aminoácido que se inserta en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces similares y contactar como la cadena lateral del aminoácido que se ha sustituido. Esto es así incluso cuando la sustitución está en una región que es crítica en la determinación de la conformación del péptido.

10 Las sustituciones no conservativas son posibles con la condición de que éstas no interrumpen la función de los polipéptidos de dominios de unión al ADN. Hablando ampliamente, serán posibles menos sustituciones no conservativas sin alterar la actividad biológica de los polipéptidos.

15 La determinación del efecto de cualquier sustitución (y, de hecho, de cualquier delección o inserción de aminoácidos) está completamente dentro de las habilidades rutinarias del experto en la materia, quien puede determinar fácilmente si una variante de polipéptido retiene las propiedades fundamentales y la actividad de la proteína básica. Por ejemplo, cuando se determina si una variante del polipéptido cae dentro del ámbito de la invención, el experto en la materia determinará si los complejos que comprenden la variante retienen la actividad biológica (por ejemplo muerte de células tumorales) de complejos formados por formas sin plegar de la proteína nativa y el polipéptido tiene al menos un 60 %, preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, aún más preferentemente un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de la proteína nativa.

20 Las variantes del polipéptido pueden comprender o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácido con al menos un 70 % de identidad, por ejemplo al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con una secuencia de proteína nativa tal como una secuencia de alfa-lactalbúmina o de lisozima.

25 El nivel de identidad de secuencia se determina de forma adecuada usando el programa de ordenador BLASTP con las secuencias de proteínas nativas como la secuencia base. Esto significa las secuencias de proteínas nativas de la secuencia contra la que se determina el porcentaje de identidad. El software BLAST está disponible públicamente en [at http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (accesible el 12 de marzo de 2009).

30 En una realización particular, el polipéptido es una  $\alpha$ -lactalbúmina tales como una  $\alpha$ -lactalbúmina humana, bobina u ovina. Aunque las variantes de estas como se describe anteriormente pueden ser útiles en la invención, para uso nutracéutico en particular, puede ser preferible utilizar las proteínas nativas en los productos. Una realización particular usó  $\alpha$ -lactalbúmina humana. En otra realización, la  $\alpha$ -lactalbúmina es  $\alpha$ -lactalbúmina bovina. La secuencia de un amplio intervalo de  $\alpha$ -lactalbuínas se conoce en la bibliografía, por ejemplo como se muestra en Watanabe y col., J. Vet Med Sci, (2000) 62(11); 1217-1219.

35 En otra realización, el polipéptido comprende una proteína recombinante que tiene la secuencia de  $\alpha$ -lactalbúmina o un fragmento de la misma pero que carece de enlaces disulfuro intra-moleculares o reticulaciones. Asegurando que la proteína recombinante carece de reticulaciones disulfuro intra-moleculares, la molécula será tridimensionalmente no nativa y completamente inactiva en términos de su actividad biológica endógena original. Esto se logra cambiando los restos de cisteína en la  $\alpha$ -lactalbúmina nativa por otros restos, en particular restos de alanina. Preferentemente se cambiarán todos los restos de cisteína por otros restos, tales como restos de alanina. En particular la proteína recombinante se basa en la secuencia de la  $\alpha$ -lactalbúmina humana pero la  $\alpha$ -lactalbúmina de otras fuentes, incluyendo  $\alpha$ -lactalbúmina bovina u ovina, puede usarse para derivar la proteína recombinante.

45 En una realización particular, el polipéptido es una proteína recombinante que tiene la secuencia de la  $\alpha$ -lactalbúmina madura nativa pero que tiene todas las cisteínas encontradas en las posiciones 6, 28, 73, 77, 91, 111 y 120 en la secuencia de longitud completa de la  $\alpha$ -lactalbúmina humana madura mutadas a otros aminoácidos, tales como alanina, que no dan lugar a puentes disulfuro. De esta manera en particular una proteína que puede utilizarse de acuerdo con la invención comprende una proteína de SEQ ID NO 1.

KQFTKAELSQLLKDIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQAIVENNESTEYGLFQISNKLWA  
KSSQVPQSRNIADISADKFLDDDDITDDIMAAKKILDIKGIDYWLAHKALATEKLEQWLAE  
KL (SEQ ID NO 1)

donde la fuente en negrita indica posiciones de mutaciones de cisteínas en la  $\alpha$ -lactalbúmina humana nativa.

Como se informa en el documento WO2010079362, los restos de aminoácidos adicionales, por ejemplo, hasta 20 aminoácidos, pueden unirse en N y/o C terminal de la proteína, si es adecuado, por ejemplo para fines de expresión. De esta manera, en particular, una proteína recombinante como se muestra en la SEQ ID NO: 1 pero con una metionina adicional en el N terminal (SEQ ID NO: 2 mostrada a continuación) se ha usado en el complejo de la invención.

MKQFTKAELS~~QL~~LKDIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQAIVENNESTEYGLFQISNKL  
WAKSSQVPQSRNIADISADKFLDDDDITDDIMAAKKILDIKGIDYWLAHKALATEKLEQWL  
AEKL (SEQ ID NO 2)

El polipéptido usado en el complejo está adecuadamente en forma pura y se prepara adecuadamente usando procedimientos convencionales de síntesis peptídica o por expresión recombinante. En particular, puede insertarse ADN que codifica la  $\alpha$ -lactalbúmina recombinante requerida en vectores de expresión adecuados tales como plásmidos, que pueden emplearse después para transformar células hospedadoras, por ejemplo, células procariotas tales como *E. coli* o células eucariotas tales como células de insectos particulares usando procedimientos convencionales.

Adecuadamente los ácidos grasos o lípidos incluyen aquellos que se sabe que proporcionan complejos biológicamente activos. Estos incluyen ácidos grasos, por ejemplo como se describen en el documento WO2008058547. Cuando se usan sales, éstas son adecuadamente solubles sales hidrosolubles. Los ejemplos particulares de estas sales pueden incluir sales de metales alcalinos o alcalinotérreos. En una realización particular, la sal es una sal metálica alcalina tal como una sal de sodio o de potasio. Cuando se usan en productos farmacéuticos, las sales serán farmacéuticamente aceptables y serán adecuadas para uso alimenticio cuando se usan en productos nutracéuticos.

Los ejemplos farmacéuticos de ácidos grasos o lípidos usados en la presente invención son aquellos que tienen de 4-30, por ejemplo de 6 a 28, tal como de 8 a 26 átomos de carbono. En realizaciones particulares, el ácido graso o lípido tiene de 10 a 24, tal como de 12 a 22, por ejemplo de 14 a 20 átomos de carbono. En particular, el ácido graso o lípido tendrá 16, 17, 18 o 20 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados.

En particular sin embargo, los complejos de la invención utilizan sales de ácidos que tienen 18 átomos de carbono. Un ejemplo específico es una sal de ácido oleico y en particular una sal de ácido oleico C18:1 de fórmula  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  o  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$ .

El complejo puede prepararse usando procedimientos similares a aquellos descritos por ejemplo en el documento WO99/26979, el documento WO2008/138348 y el documento WO2010/131237, el contenido de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. No solamente se ha descubierto que pueden prepararse complejos poniendo en contacto  $\alpha$ -lactalbúmina sin plegar o derivados de la misma con co-factores en particular ácido oleico o sales del mismo en condiciones de intercambio iónico tales como aquellas encontradas en una columna de intercambio iónico, sino también que la incubación de soluciones de  $\alpha$ -lactalbúmina o derivados de la misma con un co-factor a elevadas temperaturas, por ejemplo de 50-80 °C, por ejemplo de 50-70 °C y en particular entre 55-60 °C dará como resultado la producción de complejos adecuados para su uso en la invención.

Estos procedimientos sin embargo se han centrado generalmente en intentar recrear las condiciones en las que la proteína se vuelve no plegada y se compleja con iones oleicos. Dicho trabajo se ha centrado en usar proteínas puras incluyendo versiones variantes recombinantes de las proteínas base para facilitar la producción de complejos activos. Dichos materiales de partida sin embargo pueden aumentar el coste de producción.

Se sabe que los complejos obtenidos usando  $\alpha$ -lactalbúmina de fuentes distintas de leche humana y, en particular BAMLET, obtenida usando  $\alpha$ -lactalbúmina, muestra efectos cuantitativamente similares en las células y en particular en células tumorales como HAMLET (véase, por ejemplo, Rammer y col. (2010) Mol. Cancer Ther. 9(1) 24-32). Los solicitantes han descubierto que este también es el caso con un abanico de tipos celulares incluyendo células DLD-1 y HT29, que son células de cáncer de colon (véase el Ejemplo 2 en lo sucesivo en el presente documento). Por lo tanto, los efectos profilácticos demostrados en lo sucesivo en el presente documento usando HAMLET se observarían de forma similar si se usa BAMLET o composiciones basándose en BAMLET en lugar de HAMLET.

Sin embargo de forma importante, el complejo de la invención así como las composiciones que lo contienen se usan en la prevención de cánceres del tracto gastrointestinal. De esta manera un procedimiento para prevenir la formación de cáncer del tracto gastrointestinal comprende administrar a un individuo un complejo biológicamente activo como se describe anteriormente o una composición que contiene dicho complejo tal como una composición farmacéutica o nutracéutica así como una composición derivada de leche como se describe anteriormente. La cantidad de complejo administrada a un individuo dependerá de una diversidad de factores incluyendo la naturaleza de la composición así como el factor de riesgo. Sin embargo, como una regla general se usa de 1  $\mu\text{g}$  a 200 mg/dosis por ejemplo de 2 a 200 mg/dosis o de 1  $\mu\text{g}$  a 100 miligramos/dosis del complejo biológicamente activo para cada administración, que se

administra de forma adecuada diariamente.

Un número significativo de individuos heredan la susceptibilidad al cáncer de colon pero a pesar de los procedimientos diagnósticos y terapéuticos repetidos, a menudo invasivos, pueden desarrollar cáncer de colon. Los tumores primarios localizados se someten principalmente a retirada quirúrgica y desarrollos de fármacos dirigidos a enfermedad metastásica. Incluso aunque pueden identificarse los individuos susceptibles explorando mutaciones de APC, no hay disponibles fármacos profilácticos que prevengan la enfermedad familiar. Los efectos profilácticos y terapéuticos de HAMLET demostrados en los ejemplos a continuación son por lo tanto de gran significancia potencial. Los ratones APC<sup>Min/+</sup> que llevan la mutación humana se usaron como un modelo y su desarrollo del tumor espontáneo relacionado con la edad se redujo drásticamente por profilaxis de HAMLET por vía oral. Adicionalmente, en ratones con tumores establecidos, HAMLET redujo el número de tumores, el tamaño y la mortalidad. Estos efectos se acompañaron por niveles reducidos de  $\beta$ -catenina y proteínas dependientes de  $\beta$ -catenina y los análisis de expresión génica sugirieron que las células tumorales supervivientes habían tomado un camino a un fenotipo más benigno con señalización Wnt reducida y glucólisis aeróbica aumentada. Los efectos en la  $\beta$ -catenina se explicaron por mecanismos dependientes de canales iónicos y caspasa. HAMLET ofrece de esta manera un nuevo enfoque para la terapia de cáncer de colon, purgando células tumorales establecidas y emergentes de la mucosa intestinal. La administración de HAMLET por vía oral se esperaría tener beneficios clínicos, especialmente en familias FAP que llevan el gen APC mutado.

La activación aberrante de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina es fundamental para la patogénesis del cáncer de colon y el control molecular de esta ruta se ha vuelto un foco terapéutico principal. En células normales, la degradación proteasómica de  $\beta$ -catenina avanza a través de la formación de un complejo de destrucción, limitando la transcripción de genes dependientes de  $\beta$ -catenina. En células de cáncer de colon, la degradación de  $\beta$ -catenina se daña y se potencia la translocación nuclear, dejando sobrereactiva la ruta de señalización Wnt y las células propensas a tumores. Los inhibidores de Wnt extracelulares, incluyendo las proteínas relacionadas con Frizzled (SFRP) se han perseguido como productos terapéuticos potenciales y los antagonistas moleculares pequeños de la interacción proteína-proteína entre la  $\beta$ -catenina y los factores de transcripción Tcf han mostrado resultados pre-clínicos alentadores. Además, numerosos estudios epidemiológicos han detectado beneficios de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) con un mecanismo molecular recientemente unido a la inhibición de la acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina. En respuesta a HAMLET, la  $\beta$ -catenina se escindió proteolíticamente y el contenido nuclear de  $\beta$ -catenina se redujo marcadamente. El tejido poliposo restante de ratones tratados con HAMLET mostró una reducción en la tinción de  $\beta$ -catenina, VEGF, Cox-2 así como los marcadores de proliferación. Estos descubrimientos identifican HAMLET como un nuevo modificador de la ruta Wnt, que también añade la activación de rutas de muerte sin relacionar con Wnt.

HAMLET activa flujos iónicos y los inhibidores de canales iónicos que bloquean dichos flujos rescatan las células tumorales de la muerte celular inducida por HAMLET (Storm y col., Plos one (2013), 8, 3, e58578). Esta dependencia de los canales iónicos se confirmó en este punto ya que los inhibidores del flujo rescataron las células de cáncer de colon de la muerte. Además, la activación de caspasa 3 y la fragmentación de  $\beta$ -catenina requerían la activación del canal iónico, sugiriendo que los canales iónicos se activan aguas arriba de los otros puntos finales. Se describió previamente un patrón similar de fragmentación de  $\beta$ -catenina en el cáncer de colon pero la mayoría de estudios se han centrado en la destrucción proteasómica de la  $\beta$ -catenina, resultando de la fosforilación de GSK3. Sin embargo el tratamiento con HAMLET no alteró los niveles de GSK3 fosforilado o total. Se ha demostrado previamente que HAMLET dispara la activación de caspasa y una respuesta apoptótica en las células tumorales, zeiosis, despolarización de la mitocondria y liberación de citocromo C y exposición de anexina. La importancia funcional de esta respuesta no ha sido clara, sin embargo, ya que la inhibición de la caspasa no evita la muerte celular. Adicionalmente, las mutaciones p53 y la variación del genotipo Bcl2 o Bcl<sub>XL</sub> no alteran la sensibilidad de HAMLET de las células de carcinoma, enfatizando adicionalmente la apoptosis como una respuesta no implicada en la muerte celular. Este estudio sugiere una función de la caspasa 3 como un mecanismo de la fragmentación de la  $\beta$ -catenina en lugar de la muerte celular.

La carencia de selectividad por tejido tumoral es una preocupación principal en la actual terapia de cáncer de colon y los efectos secundarios pueden ser drásticos. En el presente estudio, se captó HAMLET por el tejido tumoral pero no por el tejido adyacente sano, sugiriendo que HAMLET alcanza los pólipos intestinales en ratones APC<sup>min</sup> después de la administración por vía oral, de esta manera interactuando con los tejidos tumorales y matando células tumorales. Además, se detectó HAMLET en contenidos intestinales hasta seis horas después de la administración, reflejando la resistencia relativa de la forma unida a ácidos grasos de  $\alpha$ -lactalbúmina a las proteasas intestinales. Adicionalmente, los presentes inventores no encontraron evidencia de toxicidad para el tejido intestinal, consistente con que HAMLET es un constituyente de la leche humana. Previamente, los animales que llevaban tumores con glioblastoma o cáncer de vejiga no mostraron respuestas tóxicas a HAMLET ni se registraron efectos adversos en el comportamiento animal. Los estudios humanos de papilomas de piel y cáncer de vejiga también sugirieron que la baja toxicidad se mantiene *in vivo*.

La administración de HAMLET por vía oral presenta un enfoque conceptualmente nuevo terapéutico en el cáncer de colon, que potencialmente mata células tumorales y que desplaza las células supervivientes a un fenotipo más benigno. Basándose en este espectro de actividad, el uso de HAMLET y sus formas variantes como un profiláctico oral serían de gran valor, especialmente en familias genéticamente propensas al cáncer de colon.

La invención se describirá a continuación particularmente a modo de ejemplo con referencia a las figuras que acompañan que se resumen como sigue:

**Figura 1. El tratamiento con HAMLET reduce el desarrollo del tumor intestinal y aumenta la supervivencia.** Los ratones APC<sup>min</sup> se trataron con 10 g de HAMLET, dos veces al día durante 10 días y se sacrificaron 5 semanas después del final del tratamiento o se observaron para el análisis de supervivencia hasta 40 semanas de edad. (A) Fotomicrografías de disección de segmentos del intestino delgado que muestran una disminución en el número de tumores (punta de la flecha) en ratones tratados con HAMLET. (B) Cuantificación del efecto de HAMLET en el número y el tamaño del tumor (\*\*, P<0,01) (C) Montajes completos teñidos con azul de metileno de segmentos intestinales que muestran números de tumor reducido (punta de la flecha) en ratones tratados con HAMLET. (D) Rollos suizos intestinales teñidos con E & H que muestran menos pólipos y más pequeños en ratones APC<sup>min</sup> tratados con HAMLET. (E) Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. El punto final se alcanzó cuando los ratones estaban moribundos o a las 40 semanas. Los ratones tratados con HAMLET (n = 15) mostraron una supervivencia mejorada en comparación con los ratones de tratamiento simulado (n = 15) (\*\*, P<0,01).

**Figura 2. El tratamiento con HAMLET reduce los niveles proteicos de la ruta de WNT/ $\beta$ -catenina, suprime la proliferación y es resistente a la digestión por enzimas gástricas.** (A) Inmunohistoquímica que demuestra la tinción reducida para  $\beta$ -catenina, Ciclina D1, VEGF, Cox-2 y Ki-67 en tumores tratados con HAMLET en comparación con tratamiento simulado. (B) Transferencias Western que muestran niveles reducidos de  $\beta$ -catenina, Ciclina D1, VEGF y Cox-2 en tumores tratados con HAMLET en comparación con tratamiento simulado. Los histogramas muestran los valores de densitometría medios para las transferencias de cada proteína (\*, P<0,05; \*\*, P<0,01). (C-D) Cuantificación de Ki-67, VEGF y Cox-2 en lisados tumorales. (F) Inmunotinción, usando anticuerpos anti- $\alpha$ -lactalbúmina muestran tinción intensa en pólipos intestinales (punta de flecha) que representan alta captación de HAMLET por el tejido tumoral (4 horas). El tejido sano vecino (flecha) muestra débil tinción lo que sugiere baja captación de HAMLET. (G) Transferencia Western que detecta la captación tisular de HAMLET (4 horas). Los intestinos delgados se lavaron con PBS, los tumores y los tejidos normales se recogieron separadamente para la transferencia Western. Los tumores contenían cantidades más altas de HAMLET que los tejidos adyacentes sanos. La  $\beta$ -actina fue el control de carga. USI, intestino delgado superior; DSI, intestino delgado distal. (H) Estabilidad de HAMLET en el intestino. Después de la alimentación forzada con HAMLET oral (2, 4 y 6 horas), los contenidos luminales se recogieron del estómago y segmentos del intestino delgado para transferencia Western usando un anticuerpo anti- $\alpha$ -lactalbúmina. La  $\beta$ -actina fue el control de carga.

**Figura 3. El perfilado del genoma completo identifica distintos eventos transcripcionales en tumores tratados con HAMLET.** Cinco semanas después del tratamiento con HAMLET, los tumores existentes en grupos tratados y simulados se cortaron y se extrajo el ARN total y se hibridó con matrices genómicas enteras Affymetrix MG430. (A) Mapa de calor que muestra los 500 genes más expresados diferencialmente entre los tratados con HAMLET y con tratamiento simulado, indicando que hay diferencias distintas entre los dos grupos. (B) Análisis de ruta de los genes expresados diferencialmente usando GSEA o Análisis de Ruta de Ingenuidad de la señalización resaltada de WNT y la ruta Glucolítica que se enriquece en tumores tratados con HAMLET. (C-D) Los resultados de GSEA mostraron que la ruta Glucolítica y la ruta de señalización de WNT se enriquecen en tumores tratados con HAMLET. (E) Representación esquemática de los metabolitos y las enzimas que se regularon positivamente en tumores tratados con HAMLET.

**Figura 4. Efectos de HAMLET en las proteínas de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina *in vitro*.** (A) Los cambios morfológicos en la respuesta a 35  $\mu$ M de HAMLET se examinaron por microscopio holográfico de contraste. HAMLET provocó el rodeo rápido y la separación de las células de cáncer de colon de manera dependiente del tiempo (B) Pérdida de viabilidad dependiente de dosis en células de cáncer de colon humanas (DLD1) después del tratamiento HAMLET (3 horas), se cuantificó por mediciones de ATP y Prestoblue. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001. (C) Disminución en los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina, ciclina D1 y VEGF en células DLD1 después del tratamiento HAMLET (3 horas, 0,5 mg/ml), La  $\beta$ -actina fue el control de carga. (C) Las células tratadas con HAMLET habían perdido la tinción nuclear de  $\beta$ -catenina (verde). La tinción citoplasmática uniforme se reemplazó por una fuerte tinción en la membrana citoplasmática. Las monocapas de células DLD1 se trataron con HAMLET (1 y 3 horas), se fijaron, se sometieron a inmunotinción para  $\beta$ -catenina (verde) con contratinción (roja) para DRAQ5 nuclear. HAMLET redujo significativamente la tinción de  $\beta$ -catenina nuclear en células tratadas. \*\* p < 0,01 \*\* p < 0,01. (E) Degradación dependiente de dosis de HAMLET  $\beta$ -catenina (F) IP para células tratadas 1 h con HAMLET 35  $\mu$ M (G) Desfosforilación de  $\beta$ -catenina en respuesta al tratamiento con HAMLET 35  $\mu$ M de una manera dependiente del tiempo. (H) Escisión dependiente del tiempo de caspasa 3 en células DLD-1 pero sin efecto en la fosforilación de GSK3.

**Figura 5. Degradación dependiente de canal iónico y translocación nuclear de  $\beta$ -catenina.** (A) Las células DLD-1 se pretrataron con inhibidores de canales iónicos (Amilorida y BaCl<sub>2</sub>) o caspasas (zVAD y leupeptina) como se indica y posteriormente se tratan con HAMLET (35  $\mu$ M, 1 hora). Los inhibidores de canales iónicos así como zVAD abrogaron la escisión de  $\beta$ -catenina pero no la leupeptina. (B) La pérdida inducida por HAMLET (35  $\mu$ M, 1 hora) de la tinción nuclear de  $\beta$ -catenina (verde) se evitó por el pretratamiento con inhibidores del canal iónico. Los núcleos se tiñeron de rojo con Draq5. (C) Se usó un ensayo indicador de luciferasa dual TOP-flash para cuantificar la actividad promotora dependiente de  $\beta$ -catenina en células tratadas con HAMLET frente a control. Se detectó una reducción dependiente de dosis después de 3 horas de tratamiento HAMLET.

**Figura 6. La profilaxis de HAMLET reduce el desarrollo de tumor intestinal.** Se proporcionó a ratones

APC<sup>min</sup> 10 mg/día de HAMLET en el agua para beber durante 10 semanas y se sacrificaron a las 15 semanas de edad. (A) Fotomicrografías de disección de segmentos del intestino delgado que muestran la prevención del desarrollo tumoral (puntas de las flechas) en ratones tratados con HAMLET. (B) Cuantificación del número y el tamaño de tumores (\* P<0,01) (C) Rollos suizos intestinales teñidos con E & H que muestran menos pólipos y más pequeños en ratones APC<sup>min</sup> que reciben profilaxis HAMLET. Los ratones del grupo HAMLET (*n* = 10) mostraron prevención del desarrollo tumoral en comparación con los ratones de tratamiento simulado (*n* = 10) (\*\*, P<0,01).

**Figura 7. Régimen de tratamiento para el uso de HAMLET como un producto terapéutico por vía oral.** Se dio comida forzada oralmente a ocho a diez ratones macho de diez semanas con 10 mg de HAMLET en 400 µl de PBS, dos veces al día durante diez días. Los ratones se sacrificaron 5 semanas después del final del tratamiento con HAMLET y se recogieron muestras de tejido intestinal para análisis adicional.

**Figura 8. Histología de secciones intestinales teñidas con H&E de ratones APC min tratados con HAMLET y control.** Se observó hiperplasia de los vellos intestinales en ratones sin tratar pero no en los tratados con HAMLET.

**Figura 9. Rutas enriquecidas en muestras control en comparación con tratadas con HAMLET (A)**

El análisis de ruta de ingenuidad de los genes enriquecidos en ratones de tratamiento fingido en comparación con tratados con HAMLET sugirió una actividad aumentada de las rutas de inmunidad. (B) Respuesta transcriptómica *in vitro* en células DLD-1. Para identificar rutas alteradas por el tratamiento con HAMLET, se empleó Análisis de Impacto de Ruta de Señalización (SPIA, por sus siglas en inglés). Un bi-dimensional donde el eje X muestra la evidencia de sobrerepresentación mientras que el eje Y muestra la evidencia de perturbación. (C) Las cinco rutas más impactadas por el tratamiento con HAMLET mostraron una activación del Procesamiento de proteínas en la interacción de ER y el receptor de citocinas y la inhibición de dos rutas generales de cáncer así como la inactivación de la ruta de infección de HTLV-I.

**Las Figuras 10 - 12** son gráficos que muestran una comparación de la actividad celular de complejos del primer aspecto de la invención derivado de la alfa lactalbúmina humana (HAMLET) y alfa lactalbúmina bovina (BAMLET) cuando se ensayan en un abanico de células de carcinoma usando un ensayo de viabilidad celular que mide el nivel de ATP a las 3 horas y también usando un ensayo de viabilidad celular PrestoBlue.

**La Figura 13** muestra el resultado de experimentos de flujo iónico llevados a cabo usando HAMLET y BAMLET.

## Ejemplo 1

### Prevención del cáncer de colon

#### **MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

##### ***Producción de HAMLET***

HAMLET se produjo como se describe (Svensson M. y col. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 4221-4226). Brevemente, la  $\alpha$ -lactalbúmina nativa se purificó a partir de leche humana por cromatografía de interacción hidrófoba. La proteína se desplegó con EDTA, se sometió a cromatografía de intercambio iónico en una matriz pre-acondicionada con ácido oleico y se eluyó con alta sal. HAMLET se liofilizó después de la purificación y se mantuvo congelada hasta su uso.

##### ***Cultivo celular y ensayos de muerte celular***

Se cultivaron células de carcinoma de colon (ATCC, Manassas, VA) en RPMI-1640 con aminoácidos no esenciales (1:100), piruvato sódico 1 mM, 50 µg/ml de gentamicina (todos de Gibco, Paisley, RU) y suero de ternera fetal (FCS) al 5 % (A549 y A498) o al 10 % (HeLa y Jurkat), respectivamente.

##### ***Tratamiento in vivo con HAMLET***

Se obtuvieron ratones *Apc*<sup>Min/+</sup> de Jackson Laboratories y se criaron en el Biological Resource Center, Biopolis, Singapur, o la instalación animal, MIG, Lund University, Suecia. Para el protocolo de tratamiento detallado, véase la Figura 7. Se alimentaron de forma forzada oralmente ocho a diez ratones macho de diez semanas con 10 mg de HAMLET en 400 µl de PBS, dos veces al día durante diez días. A los ratones no se les dio agua o alimento 5 horas antes de la administración de HAMLET. El alimento y el agua se proporcionaron 30 minutos después de la administración oral de HAMLET. Los ratones se sacrificaron 5 semanas después del final del tratamiento con HAMLET y las muestras de tejido intestinal se recogieron para el análisis adicional. Se usó un tratamiento similar en los grupos de estudio de supervivencia donde los ratones se observaron hasta las 40 semanas de edad. Todos los procedimientos estaban de acuerdo con las recomendaciones de *Institutional Animal Care and Use Committee*.

##### ***Enumeración de tumores y recogida de muestras***

Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>; la sangre y los bazo se recogieron para su análisis. El tracto gastrointestinal entero se retiró y se mantuvo en PBS enfriado con hielo para la disección. El estómago y el ciego no se incluyeron en el análisis debido a baja incidencia de tumores. El intestino delgado se cortó en 3 segmentos de igual longitud. Para retirar los contenidos intestinales, cada segmento se enjuagó con PBS enfriado con hielo con la ayuda de una aguja con sonda unida a una jeringa. Cada segmento se mantuvo en un papel de filtro y se abrió

longitudinalmente. Los números tumorales y el tamaño se determinaron usando un microscopio de disección Olympus.

#### **Tinción de azul de metileno**

5 Los segmentos intestinales abiertos se extendieron en plano entre hojas de papel de filtro y se fijaron durante toda la noche en formalina tamponada neutra al 10 %. Las secciones fijadas en formalina se transfirieron a etanol al 70 % y se tiñeron con azul de metileno al 0,2 %. Las secciones teñidas se enjuagaron en agua desionizada y se formaron imágenes con microscopio de disección.

#### **Inmunohistoquímica**

10 Los rollos suizos de segmentos intestinales abiertos longitudinalmente se fijaron durante toda la noche en formalina tamponada neutra al 10 %. Las muestras se embebieron en parafina y se procesaron adicionalmente secciones gruesas de 5  $\mu\text{m}$  para la inmunohistoquímica. Para la inmunocitoquímica las células se hicieron crecer en una diapositiva de vidrio de 8 cámaras (Lab-Tek, Chamber Slide, Thermo Fisher Scientific) a una concentración de  $5 \times 10^4$  células por pocillo durante toda la noche a 37 °C. Todas las células se permeabilizaron (Triton X-100 al 0,1 % disuelto en FCS-PBS al 5 %, 10 min), se bloquearon (FCS al 10 %, 1 h) y se tiñeron con anticuerpo antirratón  $\beta$ -catenina (dilución 1:50, BD Bioscience) durante toda la noche a 4 °C seguido de anticuerpo secundario marcado con Alexa-Fluor 448 (1:200, Molecular Probes) durante 1 h. Se usó DRAQ-5 (Bioscience, San Diego, CA) como un tinte nuclear (1:500, 5 min). Las células se montaron con medios de montaje (Fluoromount, Sigma) y la fluorescencia se detectó en un microscopio confocal LSM 510 DUO (Carl Zeiss). Para la Formación de imagen Holográfica de Fase, se usó un microscopio holográfico digital HoloMonitor™ M2 (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Suecia) con estructura de grabación 3D de las células por su exposición a láser HeNe 0,8 mW (633 nm) usando inducción de frentes de ondas de interferencia.

#### **Captación de HAMLET in vivo**

25 Después de 5 h de inanición, a los ratones se les forzó a comer oralmente con 10 mg de HAMLET en 400  $\mu\text{l}$  de PBS. Después de 2, 4 y 6 horas de administración, los ratones se sacrificaron con inhalación de CO<sub>2</sub>. Para detectar HAMLET en la luz intestinal, se recogieron 5 cm de segmentos intestinales del intestino delgado superior o inferior y se lavaron con 500  $\mu\text{l}$  de PBS enfriado en hielo. Se añadió tampón de lisis SDS (2 %) y los lavados intestinales se calentaron (5 min, 95 °C), se sometieron a vórtex, se calentaron de nuevo y se centrifugaron en alto durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se usó para transferencias Western para la detección de HAMLET.

30 Para la detección de HAMLET en tejido tumoral, los segmentos de intestino se aclararon exhaustivamente (5 ml de PBS, 3X) para retirar los contenidos luminales. Los segmentos se abrieron longitudinalmente y se lavaron de nuevo en PBS (5 ml PBS, 3X).

#### **Transferencias Western**

35 Los tumores y el tejido intestinal sano se recogieron y se mantuvieron a -80 °C. Los lisados de tejido en tampón SDS al 2 % se sometieron a SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se incubaron después con anticuerpos primarios incluyendo  $\beta$ -catenina (1:4000, BD, Biosciences), p- $\beta$ -catenina (1:1000, Cell Signaling), actina (1:2000, Sigma), GAPDH (1:4000, Novus Biologics) y se visualizaron usando ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

#### **Medición de actividad COX-2 y VEGF**

40 La actividad COX-2 se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cayman Chemicals). Brevemente, las muestras intestinales se homogeneizaron en tampón de lisis enfriado en hielo (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, suplementado con mezcla inhibidora de proteasa (Sigma-Aldrich)) durante 20 segundos. Los homogenatos se centrifugaron (10.000 x g, 15 min, 4 °C), los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80 °C para el análisis posterior. Los resultados se corrigieron para el contenido de ADN de la muestra de tejido y se expresaron como número de veces de aumento sobre el control. VEGF se cuantificó por ELISA en el tejido de tumor intestinal después de enjuagar con PBS, homogeneizar y almacenar durante toda la noche a -20 °C. Se realizaron dos ciclos de congelación-descongelación para romper las membranas celulares y los homogenatos se centrifugaron (5.000 x g, 5 min, 4 °C) y se almacenaron a -80 °C para el análisis posterior. Se realizó ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Quantikine Mouse VEGF, R&D Systems), corte > 3,0 pg/ml.

#### **Ensayo de función hepática**

50 La actividad de ALT y AST en suero se determinó por el Reactivo ALT Infinity y el Reactivo AST Infinity (ambos de Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **Microscopio confocal**

Las células se cultivaron durante toda la noche en RPMI-1640 con aminoácidos no esenciales (1:100), piruvato sódico 1 mM, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Gentamicina (todos de PAA, Pasching, Austria) y suero de ternera fetal (FCS) en

diapositivas de vidrio de 8 cámaras (Nalge Nunc, Rochester, NY). Las células se incubaron con HAMLET (0,3 o 0,5 mg/ml, 1 y 3 horas) en RPMI-1640 libre de suero (FCS se añadió después de 1 hora) y se fijó con formaldehído al 3,7 %. Las células desprendidas se centrifugaron en diapositivas de microscopio (Menzel-Glaser Polysine slides, Thermo Scientific, Braunschweig, Alemania) usando un Cytospon (500 rpm, 5 min), permeabilizado con Triton X-100 al 0,25 %/ FCS al 5 % /PBS durante 10 min y se tiñeron con anticuerpos anti- $\beta$ -catenina (1:20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-ciclina D1 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-Ki-67 (1:50, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) o anti-Cox-2 (1:50, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) seguido del anticuerpo secundario marcado Alexa-Fluor 488 (anti-ratón, 1:100, Molecular probes, Eugene, OR, EE.UU.). Para la tinción nuclear se usó DRAQ5 (1:500, eBioscience, San Diego, CA). Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal (LSM510 META, Carl Zeiss, Jena, Alemania) con ajustes de poro iguales a 1 unidad Airy para la detección de fluorescencia.

### **Análisis transcriptómico**

Para los análisis transcriptómicos, los tumores se recogieron 5 semanas después del final del tratamiento y se almacenaron en RNAlater (Ambion). Se homogeneizaron aproximadamente 5 mg de tejido usando un Tissuelyser (Qiagen) y el ARN total se extrajo usando RNeasy (Qiagen). Para el análisis transcriptómico, se convirtieron 300 ng de ARN total en ARNc usando el Kit Affymetrix 3' IVT Express según las instrucciones del fabricante. 10  $\mu$ g de ARNc marcado se hibridaron con Tiras de Matrices Affymetrix MG-430 PM. Después de la hibridación y el lavado, la intensidad de fluorescencia se midió en el sistema Affymetrix Gene Atlas. Los datos de matrices se normalizaron usando el promedio multichip robusto (RMA, por sus siglas en inglés) y se filtró para valores de expresión menores de 2<sup>5</sup>. Los genes expresados diferencialmente se identificaron ajustando los datos normalizados a un modelo lineal y los 500 genes que mostraran los menores p-valores se consideraron expresados diferencialmente. Para identificar alteraciones funcionalmente relevantes, el listado génico se sometió a Análisis de Ruta de Ingenuidad. El análisis de enriquecimiento de ajuste génico (GSEA, por sus siglas en inglés) se realizó mediante el uso de la colección de Rutas Canónicas de Geneset v. 2.5 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>). El conjunto de datos de micromatrices informado en este punto se ha depositado en Gene Expression Omnibus de NCBI y estará accesible en el momento de la publicación.

### **Análisis estadísticos**

Los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM. Los grupos tratados y control se compararon con el uso del ensayo de la t de Student de dos colas y el ensayo del chi-cuadrado con corrección de Yates y 1 grado de libertad. Las diferencias en la supervivencia se evaluaron por el análisis de Kaplan-Meier con un ensayo de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

## **RESULTADOS**

### ***HAMLET reduce la carga tumoral y aumenta la supervivencia***

HAMLET se administró por vía oral a ratones APC<sup>Min/+</sup> (10-12 semanas de edad) que llevaban tumores y se evaluó el desarrollo de tumores, cinco semanas después del final del tratamiento (Figura 7). La administración de HAMLET por vía oral provocó una reducción significativa en el número de tumores y el tamaño tumoral en comparación con los ratones sin tratar (Figura 1A-E). La cuantificación por microscopio de luz de magnificación baja de segmentos intestinales abiertos longitudinalmente mostró que el número total de pólipos se redujo en aproximadamente un 60 % en el grupo tratado con HAMLET (Figura 1B, p<0,01). Una reducción en el número y el tamaño de pólipos también fue evidente en las secciones teñidas con azul de metileno de segmentos intestinales (Figura 1C). La tinción de H&E de secciones de "rollos suizos" de los segmentos intestinales mostró diferencias significativas en comparación con ratones sin tratar, ya que se observaron menos tumores y más pequeños (Figura 1D). La hiperplasia de vellos intestinales se observó en ratones sin tratar pero los ratones tratados mostraron vellos normales (Figura 8). Adicionalmente, el régimen HAMLET por vía oral también protegió a los ratones contra la mortalidad asociada a tumores, mostrado como una curva de Kaplan hasta 40 semanas de seguimiento, Figura 1E (p<0,01).

### ***Niveles reducidos de proteínas de la ruta de $\beta$ -catenina en tumores tratados***

Para examinar si los efectos de HAMLET podrían explicarse por modulación de la ruta de señalización Wnt, las proteínas  $\beta$ -catenina y dependientes de  $\beta$ -catenina se cuantificaron en biopsias de tumor cinco semanas después del inicio del tratamiento con HAMLET. Las secciones de tejido obtenidas de tumores tratados con HAMLET o control se tiñeron con anticuerpos específicos y anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa (Figura 2A). La tinción de  $\beta$ -catenina se redujo marcadamente en los tejidos tumorales tratados con HAMLET, en comparación con controles sin tratar. Esta diferencia en los niveles de  $\beta$ -catenina se confirmó por transferencias Western en homogenatos de tejido tumoral (Figura 2B), sugiriendo que HAMLET provoca una reducción en los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina.

Para examinar si HAMLET modifica la expresión de proteínas aguas abajo de la  $\beta$ -catenina, las secciones de tejido obtenidas de tumores tratados con HAMLET o control se tiñeron con Ciclina D1, Cox-2 y anticuerpos específicos de VEGF (Figura 2A). La tinción de ciclina D1 se redujo en tumores de ratones tratados con HAMLET en comparación con ratones sin tratar y la tinción de VEGF y Cox-2 mostró un patrón similar (Figura 2B). Esta reducción en los

niveles de proteínas de Ciclina D1 se confirmó por transferencias Western ( $p < 0,01$ ) y la reducción en VEGF y Cox-2 por ELISA de extractos de tejidos (Figura 2D y 2E,  $p < 0,01$ ). Finalmente, una reducción marcada en la frecuencia de células Ki-67 positivas (Figura 2C) sugirió que la proliferación se reduce en tumores tratados con HAMLET en comparación con tumores sin tratar.

- 5 Los resultados sugieren que el tratamiento de HAMLET reduce los niveles de  $\beta$ -catenina así como la expresión de proteínas dependientes de  $\beta$ -catenina en las células tumorales supervivientes.

**HAMLET se capta por las células tumorales y es resistente a enzimas gástricas**

10 La captación de HAMLET desde la luz gastrointestinal en tumores se visualizó en secciones de tejido fijado en formalina, 6 horas después de la administración de HAMLET. Se mostró que HAMLET se acumula en los tumores (Figura 2F), con fuerte tinción nuclear. La mayoría de células sanas adyacentes eran negativas pero algunas células crípticas mostraron débil tinción nuclear con HAMLET, sugiriendo un bajo grado de captación por células rápidamente proliferantes. Las diferencias en la captación de HAMLET entre pólipos o tejido sano de ratones individuales se confirmaron por transferencias Western de extractos tisulares (Figura 2G).

15 Para examinar si HAMLET resiste la degradación proteolítica *in vivo*, los contenidos gastrointestinales se recogieron después de la alimentación forzada con HAMLET y se sometieron a transferencias Western, usando anticuerpos específicos de alfa-lactalbúmina (Figura 2H). Se detectaron bandas de 14 kDa en los contenidos del estómago y el intestino delgado distal, 6 horas después de la administración oral, sugiriendo que parte del complejo HAMLET se mantiene intacto en el tracto gastrointestinal.

20 **El perfilado del genoma completo identifica distintos eventos transcripcionales en tumores tratados con HAMLET**

25 La respuesta *in vivo* a largo plazo a HAMLET se caracterizó además por el perfilado transcripcional del genoma completo de tumores escindidos de ratones tratados con HAMLET o controles con tratamiento simulado. El ARN tumoral total de ocho animales (5 semanas después del tratamiento) se hibridó con Matrices Affymetrix MG-430 PM y se identificaron cambios transcripcionales funcionalmente relevantes usando un enfoque bioinformático comprensivo. Para tener en cuenta la variación experimental, se aplicó ensayo estadístico (modelos lineales moderados de Bayes empíricos) entre grupos con tratamiento simulado y tratados con HAMLET y las listas génicas resultantes se sometieron a Análisis de Ruta de Ingenuidad. Adicionalmente, las rutas importantes asociadas a los tumores tratados con HAMLET se identificaron usando el análisis de enriquecimiento de ajuste génico (GSEA (Subramanian A, y col Proc Natl Acad Sci U S A 102: 15545-15550)). Los 500 genes que muestran los p-valores ajustados más bajos se muestran en la Figura 3A.

35 Los genes más altamente expresados en tumores tratados con HAMLET estaban implicados en el metabolismo de la glucosa ( $p$ -valor de ingenuidad= $10^{-9}$  y  $q$ -valor GSEA FDR = 0,05) y los genes regulados positivamente incluyeron una gran fracción de enzimas clave responsables de los flujos glucolíticos. La fosfoglucomutasa 1, fosfofructoquinasa, enolasa, piruvato quinasa M2 y alcohol deshidrogenasa estaban todas reguladas positivamente (Figura 3C y E). El análisis GSEA confirmó la alta expresión de enzimas glucolíticas, pero además, los genes asociados a la ruta de señalización de WNT se enriquecieron en los tumores tratados con HAMLET ( $q$ -valores 0,032). De acuerdo con la inhibición de  $\beta$ -catenina en tumores tratados con HAMLET (Figura 2B) los genes altamente expresados eran predominantemente reguladores negativos de esta ruta. El factor 1 inhibitorio de WNT, una proteína secretada que contiene un dominio de factor inhibitorio de WNT (WIF) y 5 dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) se reguló positivamente dos veces en tumores tratados con HAMLET como fuer SOXY17 (SRY (región Y determinante del sexo-box 17), que modula la señalización de WNT a través de la unión a WNT3A. Otros genes regulados positivamente en la ruta de señalización de WNT incluían JUN, indicando un posible papel para las MAP quinasas activadas por estrés en la respuesta a HAMLET. De forma interesante, el análisis GSEA también indicó la expresión aumentada de genes implicados en el metabolismo del retinol en tumores de ratones tratados con HAMLET. El retinol ha demostrado previamente disminuir los niveles de proteína  $\beta$ -catenina y el ARNm génico dirigido a  $\beta$ -catenina que incluye c-Myc y Ciclina D1, implicando que el procesamiento del retinol puede influir en los efectos de HAMLET en la  $\beta$ -catenina.

45 En ratones con tratamiento simulado, GSEA detectó la expresión aumentada de genes relevantes para la inmunidad adquirida y específicamente para los linfocitos T, incluyendo CD96, CD3y en el complejo TCR y KLRD1 en la ruta dependiente del receptor tipo lectina de linfocitos citolíticos naturales (Figura 9). El análisis de ingenuidad confirmó la expresión más alta de genes de inmunidad específica en tumores sin tratar y un número seleccionado de conjuntos génicos estaban muy altamente enriquecidos (FDR  $q$ -val  $< 0,0001$  y FWER  $p$ -val  $< 0,001$ ), los genes altamente enriquecidos incluyeron CD96 en el complejo MHC II, el receptor conservado CD3G y KLRD1. Las rutas de alta puntuación incluían la señalización de linfocitos T citotóxicos CTLA4, la señalización ICOS en linfocitos T ayudantes, la apoptosis de linfocitos T inducida por  $Ca^{2+}$  así como las rutas de presentación de antígenos y de linfocitos T ayudantes y señalización de IL-4.

**Efectos de HAMLET en células de cáncer de colon, in vitro**

Para entender mejor los efectos directos a corto plazo de HAMLET en oposición a los efectos más a largo plazo en los tejidos que sobreviven al tratamiento HAMLET, los presentes inventores usaron una línea celular de cáncer de colon DLD1, que llevan mutaciones inactivantes homocigotas del supresor de tumores APC (Ilyas M, y col. (1997) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 94: 10330-10334). En primer lugar, la susceptibilidad de las células DLD1 a HAMLET se determinó por evaluación morfológica, usando formación de imágenes holográficas a tiempo real. HAMLET provocó el redondeamiento celular de una manera dependiente del tiempo y una disminución en el área celular ( $p < 0,0001$  en comparación con el control, Figura 4). En paralelo, hubo un aumento en el espesor máximo ( $p < 0,001$ ). HAMLET provocó una reducción en la adherencia celular (Figura 4A), compatible con la iniciación del desprendimiento y la muerte celular. Se observó una pérdida de viabilidad dependiente de dosis y de tiempo por cuantificaciones de niveles de ATP y PrestoBlue (Figura 4B).

El efecto de HAMLET en la expresión de  $\beta$ -catenina se examinó por microscopio confocal en células fijadas, teñidas con anticuerpos específicos de  $\beta$ -catenina. HAMLET provocó un cambio rápido en la distribución de  $\beta$ -catenina. En las células control, la tinción fue difusa a lo largo de todo el citoplasma y los núcleos pero después de la exposición a HAMLET, la tinción nuclear de  $\beta$ -catenina se perdió y la tinción citoplasmática se redujo. En paralelo, la  $\beta$ -catenina se estaba acumulando en la membrana citoplasmática (Figura 4D). Por análisis de transferencia Western, se detectó una fragmentación (110 y 80 kDa) de  $\beta$ -catenina dependiente de tiempo y dosis en células DLD1 tratadas con HAMLET (Figura 4E, F, G). Previamente, la fragmentación de  $\beta$ -catenina se ha demostrado ser dependiente de caspasa. La activación por HAMLET de la caspasa 3 se detectó en las células DLD1 (Figura 4H), confirmando la activación de caspasa efectora por HAMLET en las células tumorales. Para abordar el papel de las caspasas para la fragmentación de  $\beta$ -catenina inducida por HAMLET, se usó el inhibidor pan-caspasa zVAD, con el inhibidor de cisteína proteasa leupeptina como control (Figura 5A). zVAD inhibió la fragmentación de  $\beta$ -catenina en respuesta a HAMLET, pero la leupeptina no tuvo efecto. La pérdida de tinción nuclear de  $\beta$ -catenina en respuesta a HAMLET se invirtió parcialmente por zVAD, en aproximadamente el 20 % de las células, pero no en las demás células. HAMLET también redujo la fosforilación de  $\beta$ -catenina (Figura 4G), de manera dependiente del tiempo. GSK3 $\alpha/\beta$  fosforila la  $\beta$ -catenina para la degradación proteasómica. Se excluyó la activación de GSK3 $\alpha/\beta$  por HAMLET, ya que no se detectó cambio en la fosforilación de GSK3 $\alpha/\beta$  por transferencias Western (Figura 4H), indicando que HAMLET no modula la ruta Wnt por este mecanismo.

Se ha descubierto que los canales iónicos soportan la transformación oncogénica y los tumores en ratones APC<sup>Min/+</sup> aumentaron la expresión de canales de Na<sup>+</sup> epiteliales sensibles a amilorida (EnaC). HAMLET ha demostrado recientemente que activa flujos iónicos específicos a través de las membranas de células tumorales y dichos flujos explican muchos aspectos de la respuesta a la muerte celular (Storm y col., Manuscrito). Para abordar si los flujos iónicos están implicados en los efectos de HAMLET en la homeostasia de la  $\beta$ -catenina, las células tumorales se pretrataron con los inhibidores de canales iónicos Amilorida y cloruro de bario. Por microscopía confocal, estos inhibidores se demostraron revertir la reducción inducida por HAMLET de los niveles nucleares de  $\beta$ -catenina (Figura 5B). Adicionalmente, los inhibidores del canal iónico bloquearon tanto la fragmentación de  $\beta$ -catenina como la activación de caspasa (Figura 5A).

Los niveles de proteínas Ciclina D1 y VEGF se redujeron en biopsias de tejidos de ratones tratados con HAMLET, sugiriendo que la expresión génica dependiente de  $\beta$ -catenina podría estar afectada. El ensayo indicador de la luciferasa dual TOP-flash se usó para cuantificar la actividad del promotor dependiente de  $\beta$ -catenina en células tratadas con HAMLET frente a control. Se detectó una reducción dependiente de la dosis en la actividad luciferasa después de 3 horas de tratamiento con HAMLET (Figura 5C).

Estos descubrimientos muestran que la integridad y la actividad de la  $\beta$ -catenina se altera en células de cáncer de colon tratadas con HAMLET. Este efecto se medió por los canales iónicos, que dispararon la fragmentación de la  $\beta$ -catenina 3-caspasa así como las rutas de muerte celular, consistentes con los cambios *in vivo* en la  $\beta$ -catenina y las proteínas relacionadas.

**HAMLET actúa como un agente profiláctico contra el cáncer de colon**

Para abordar si la administración de HAMLET por vía oral puede prevenir la formación de tumores, unos ratones APC<sup>Min/+</sup> estuvieron provistos de HAMLET en el agua de bebida (10 mg/ml) durante el tiempo de destete hasta la semana 17. Los controles recibieron agua de bebida solamente. Se observó una reducción marcada en el desarrollo del tumor (Figura 1). La cuantificación de pólipos en los segmentos intestinales abiertos longitudinalmente mostró una reducción en el número de pólipos en el grupo tratado con HAMLET (Figura 1B,  $p < 0,01$ ). También fue evidente una reducción en el tamaño en secciones teñidas con azul de metileno de segmentos intestinales (Figura 1C). La tinción con H&E de secciones de "rollo suizo" de los segmentos intestinales confirmó estas diferencias en comparación con los ratones control, ya que se observaron menos tumores y más pequeños (Figura 1D).

Estos resultados mostraron que además de sus efectos terapéuticos, HAMLET previene el desarrollo del cáncer de colon en ratones genéticamente susceptibles.

**Ejemplo 2**Comparación de los efectos de HAMLET y BAMLET en células tumorales

Se ejecutó un experimento para confirmar que BAMLET produjo resultados generalmente similares a HAMLET en particular en relación a un abanico de células tumorales.

5 Se produjeron HAMLET y BAMLET usando un procedimiento similar a aquel descrito en el documento WO2010/131237. En resumen, se mezcló alfa-lactalbúmina humana o bovina (Davisco) 350  $\mu\text{M}$  con oleato sódico 3,5 mM (relación proteína:lípido, 1:10) y la mezcla se incubó a 55 °C durante 10 min. La mezcla se dejó equilibrar después a temperatura ambiente durante 20 min.

10 Se ensayaron diversas concentraciones (0,1, 0,3 u 0,5 mg/ml) de BAMLET y HAMLET lado a lado para la actividad en un abanico de células tumorales usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las células usadas incluyeron A498 (células de cáncer renal), HT29 (células de cáncer colorrectal), J82 (células de cáncer de vejiga), DLD-1 y variantes (células de cáncer colorrectal) y A549 (células de cáncer pulmonar). Los resultados del nivel de ATP y los ensayos PrestoBlue se muestran en las Figuras 10-12. Estos muestran que, en comparación con un control, tanto HAMLET como BAMLET produjeron una reducción dependiente de la concentración en la viabilidad de las células tumorales y de esta manera biológicamente producen efectos cuantitativamente similares.

20 Además, como se analiza anteriormente, se ha informado que HAMLET activa los flujos iónicos en células tumorales y que esto es un factor que contribuye a la actividad (Storm y col., Plos one (2013), 8, 3, e58578). Se realizó una comparación de los efectos de HAMLET y BAMLET en los canales iónicos. Usando la metodología descrita en Storm y col. (2013 anteriormente), se midieron los flujos de potasio, calcio y sodio. Para examinar si HAMLET modula la actividad de canales iónicos en las células tumorales, los presentes inventores en primer lugar cuantificaron los cambios en  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  intracelulares. En primer lugar se precargaron células de carcinoma de pulmón con el fluoróforo Fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$ , se expusieron a HAMLET, BAMLET (ambos a 35  $\mu\text{M}$ ) o un control de PBS y se examinaron por microscopio confocal a tiempo real para los cambios en la intensidad de fluorescencia.

25 Tanto HAMLET como BAMLET dispararon un rápido aumento paso a paso del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 13B), pero con heterogeneidad considerable.

30 Con respecto a la activación del canal de potasio, el ensayo del canal de potasio ( $\text{K}^+$ ) FluxOR™ se realizó en el TECAN infinite F200 (Tecan Group, Suiza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, esto implicó tampón de carga FluxOR™ (Solución salina equilibrada de Hank (HBSS), tamponada con HEPES 20 mM y pH ajustado a 7,4 con NaOH. El concentrado Powerload™ y Probenecid hidrosoluble se usaron respectivamente para potenciar la solubilidad y la retención del tinte, respectivamente. Los medios se retiraron de las placas celulares manualmente y se aplicaron 80  $\mu\text{l}$  de tampón de carga que contenía la mezcla de tinte FluxOR™ a cada pocillo. Una vez dentro de la célula, la forma éster AM no fluorescente del tinte FluxOR™ se escinde por esterases endógenas en un indicador sensible a talio. El tinte se cargó durante 60 minutos a temperatura ambiente y después se retiró con el sobrenadante. Después de lavar con tampón PBS libre de tinte, se añadió un volumen final de 80  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo que contenía probenecid hidrosoluble.

35 Como se muestra en el primer panel en la Figura 13 (A), tanto HAMLET como BAMLET mostraron efectos de activación significativa similares en el ensayo del canal de potasio.

40 Además, se midió el influjo de sodio en las células Jurkat usando el indicador CoroNa Green Sodium. La fluorescencia se cuantificó cada intervalo de 20 segundos durante un periodo de medición total de 10 minutos. Tanto HAMLET como BAMLET dispararon un aumento de la señal de fluorescencia cuando se añadieron a las células mientras que el control PBS no lo hizo (Figura 13C).

Los resultados, especialmente la respuesta prolongada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la magnitud de la activación del canal de  $\text{K}^+$ , sugieren que la activación de canales iónicos por HAMLET distingue las células de carcinoma de las células sanas diferenciadas.

45 Está claro que los efectos en los canales iónicos son similares cuando se usa HAMLET o bien BAMLET. Esto da lugar a la conclusión de que BAMLET produciría efectos similares a HAMLET en la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un complejo biológicamente activo que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de una alfa-lactalbúmina de origen natural o una variante de la misma en el que los restos de cisteína en la alfa-lactalbúmina nativa se cambian por otros restos; o un péptido de hasta 50 aminoácidos derivados de dicho polipéptido y que comprende el Alfa 1 (restos 1-40) o Alfa 2 (restos 81-123) de la alfa-lactalbúmina humana, siendo de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4;
- 5 KQFTKXELSQLLKDIDGYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 3)  
 LDDITDDIMXAKKILDIKIDYWLAHKALXTEKLEQWLXEKL (SEQ ID NO 4) en las que X es un resto de aminoácido distinto de cisteína;
- 10 y un ácido graso o un lípido o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento profiláctico de cáncer del tracto gastrointestinal.
2. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido es una alfa-lactalbúmina, que tiene la secuencia de la alfa-lactalbúmina humana o bovina o una variante de la misma en el que los restos de cisteína en la alfa-lactalbúmina nativa se cambian por otros restos, y el ácido graso o el lípido es ácido oleico o una sal del mismo.
- 15
3. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la alfa-lactalbúmina tiene la secuencia de la alfa-lactalbúmina humana o bovina.
4. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer es cáncer de colon.
- 20
5. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en el tratamiento de individuos que tienen una predisposición genética a cáncer de colon.
6. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la predisposición genética es una mutación en el gen de la adenopoliposis colónica (APC).
- 25
7. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la mutación es un truncamiento del gen de la APC.
8. Un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la alfa-lactalbúmina es alfa-lactalbúmina humana y el complejo es HAMLET (Alfa-lactalbúmina Humana Hecha Letal para células Tumorales) o la alfa-lactalbúmina es alfa-lactalbúmina bovina y el complejo es BAMLET (Alfa-lactalbúmina Bovina Hecha Letal para células Tumorales).
- 30
9. Una composición que comprende un complejo biológicamente activo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable o un producto alimenticio.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9, que es para la administración por vía oral, o está en forma de un producto nutracéutico.
- 35

Figura 1

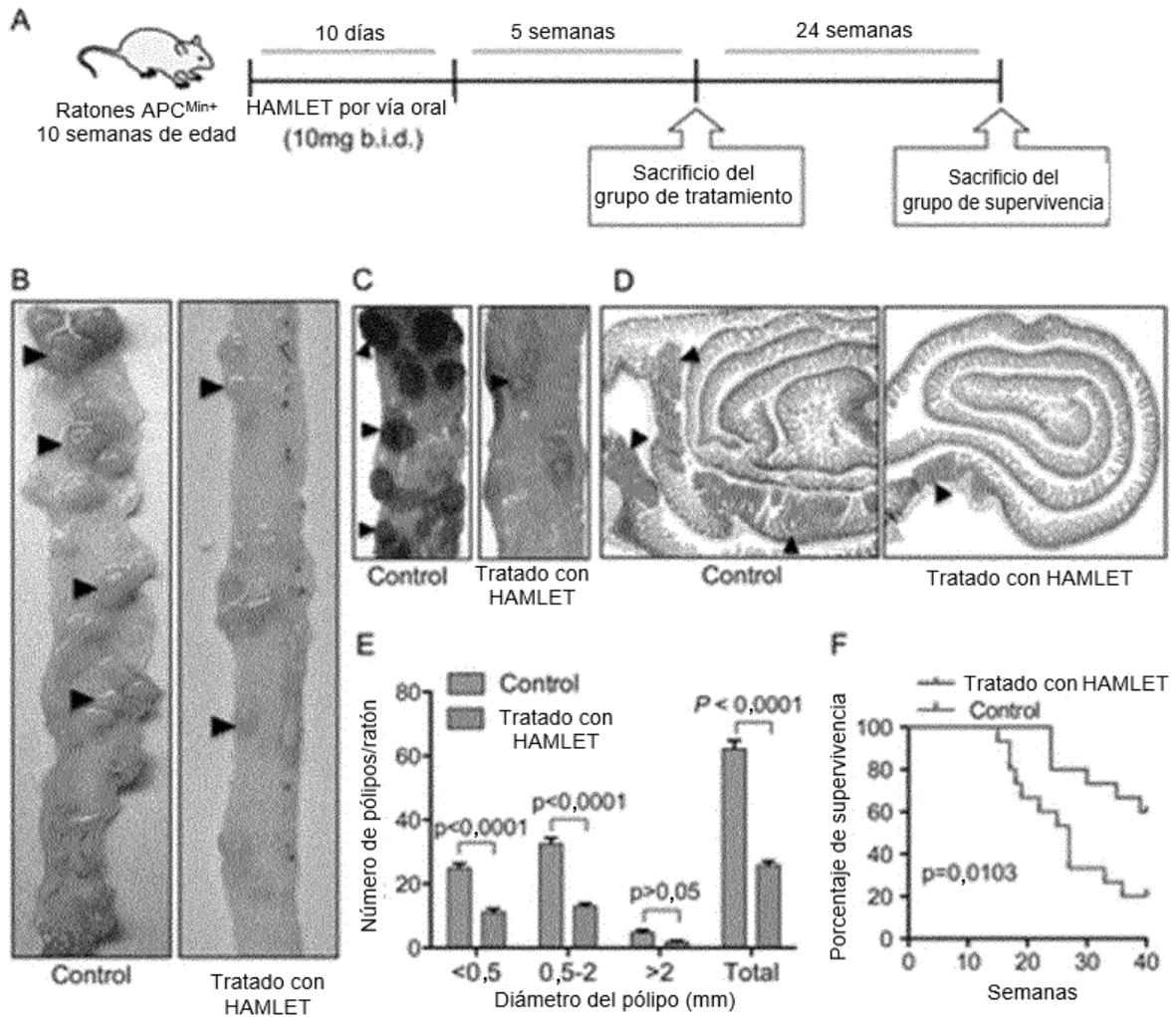


Figura 2

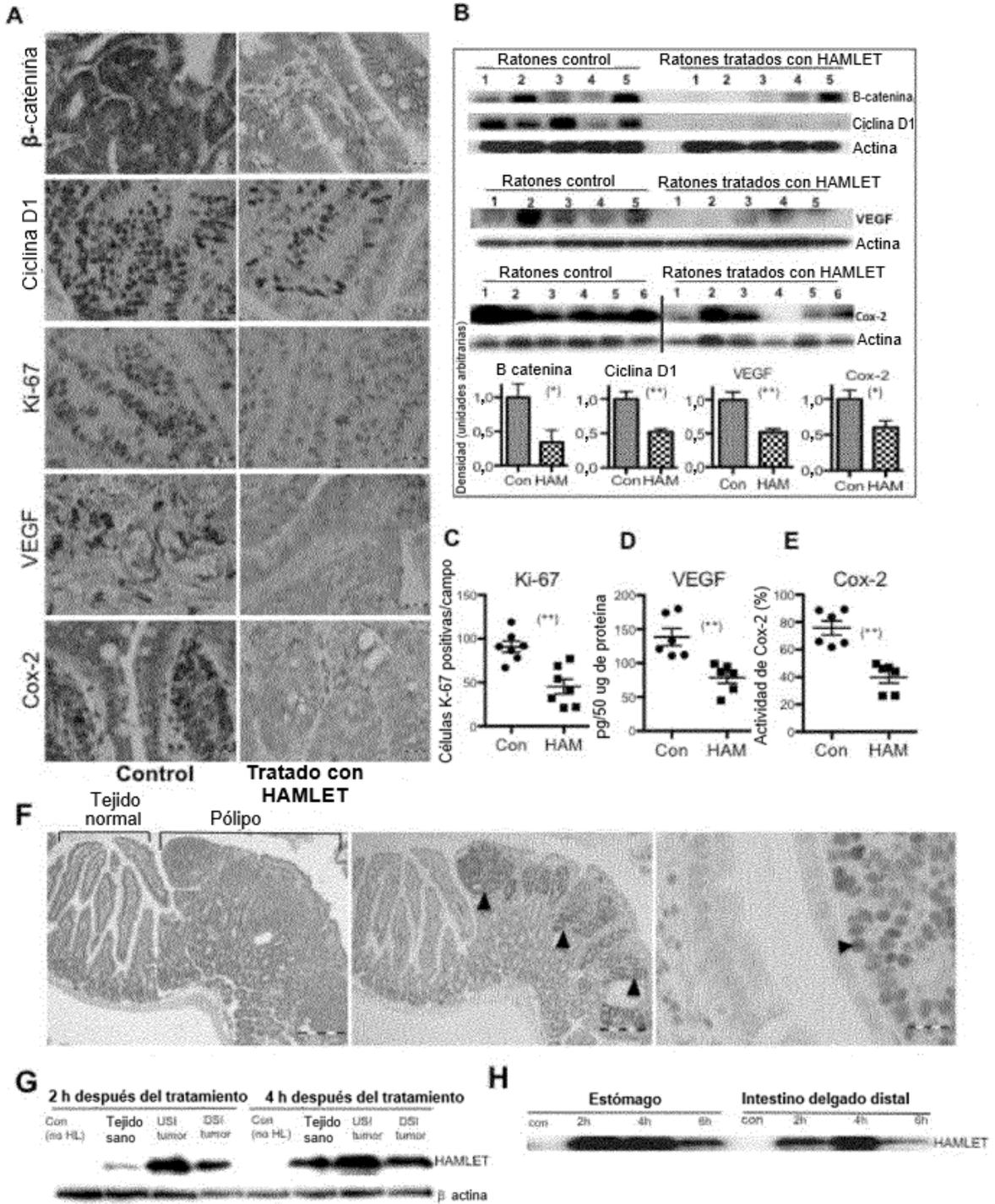


Figura 3

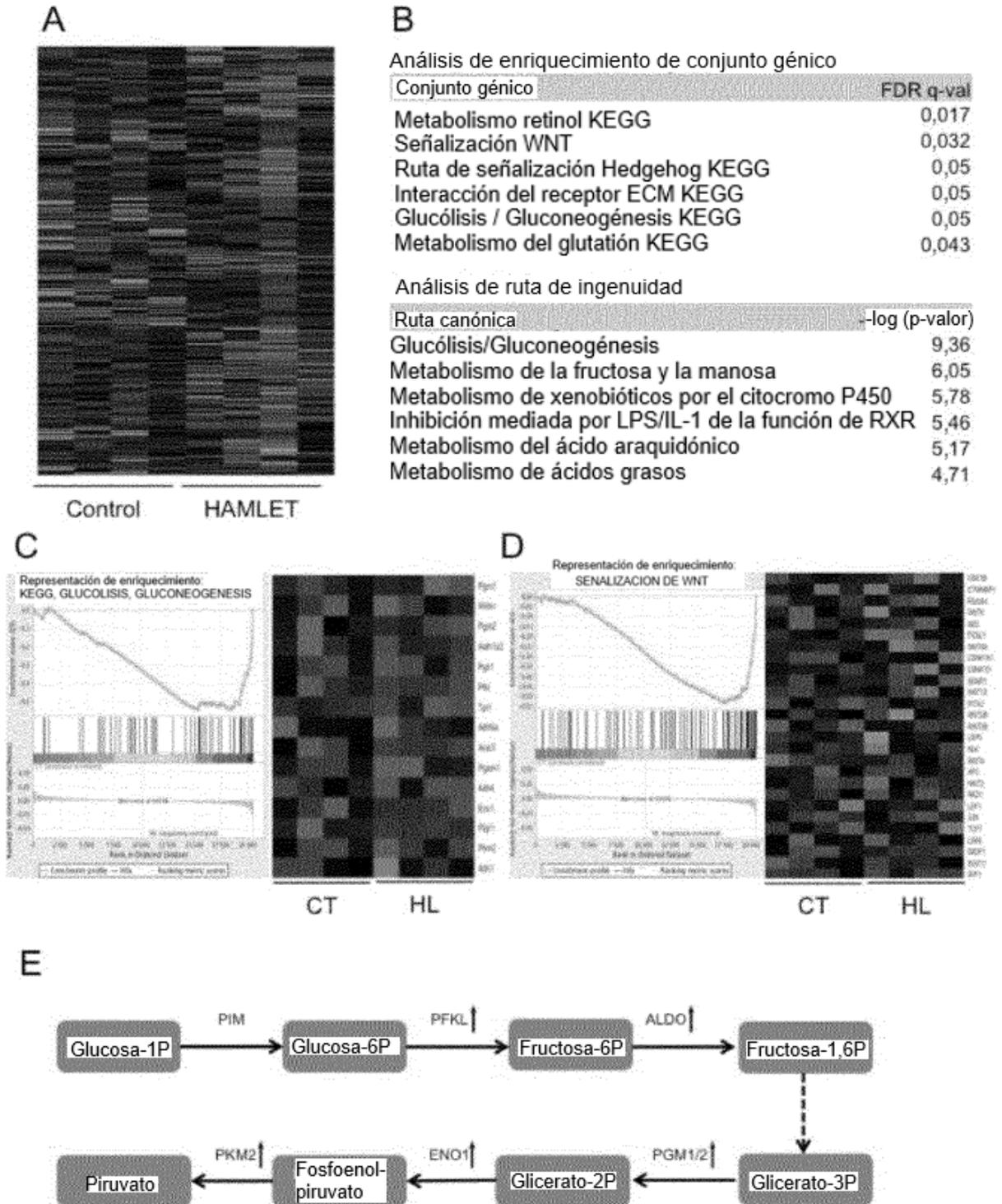


Figura 4

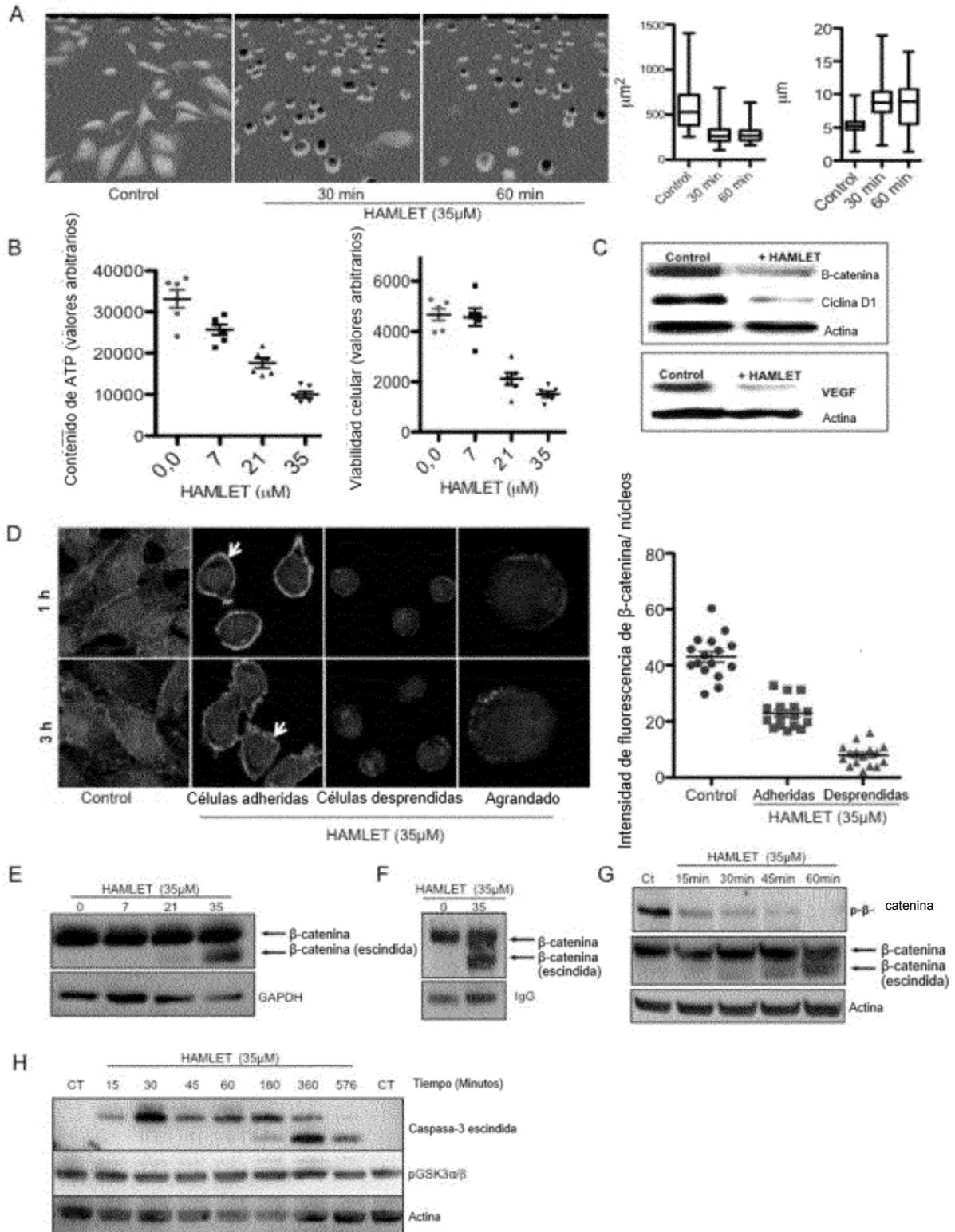


Figura 5

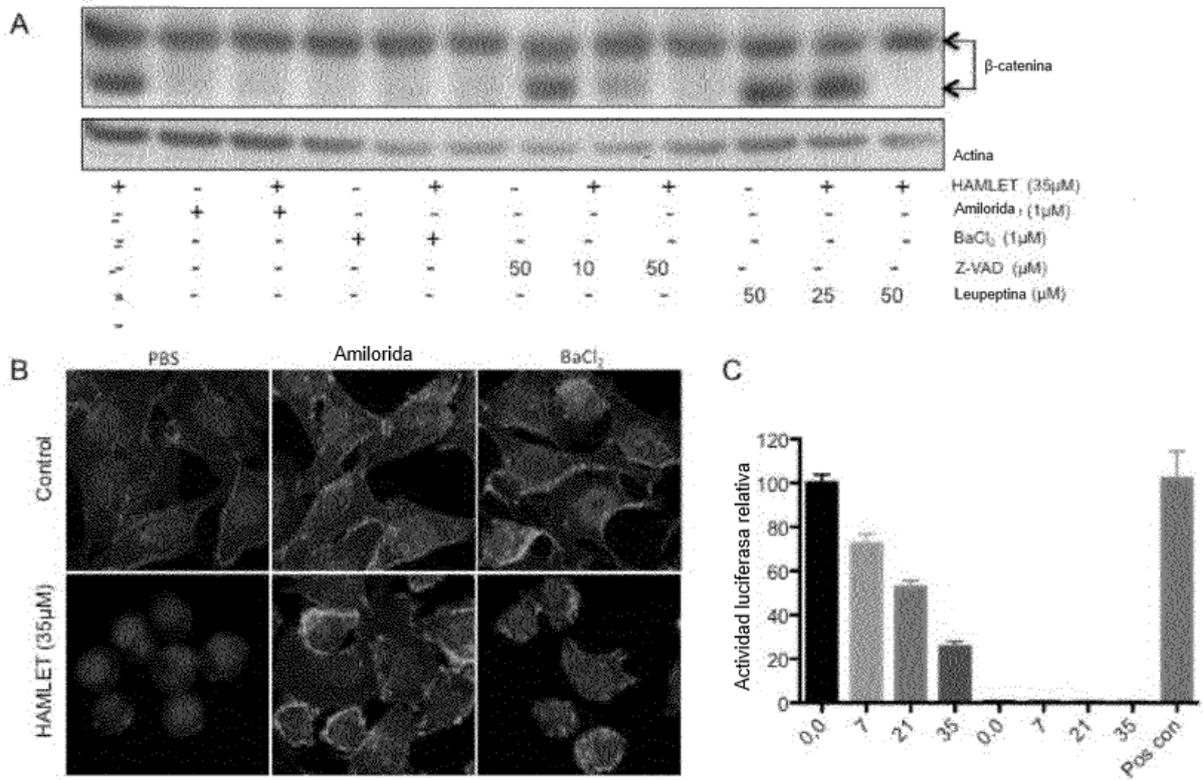


Figura 6

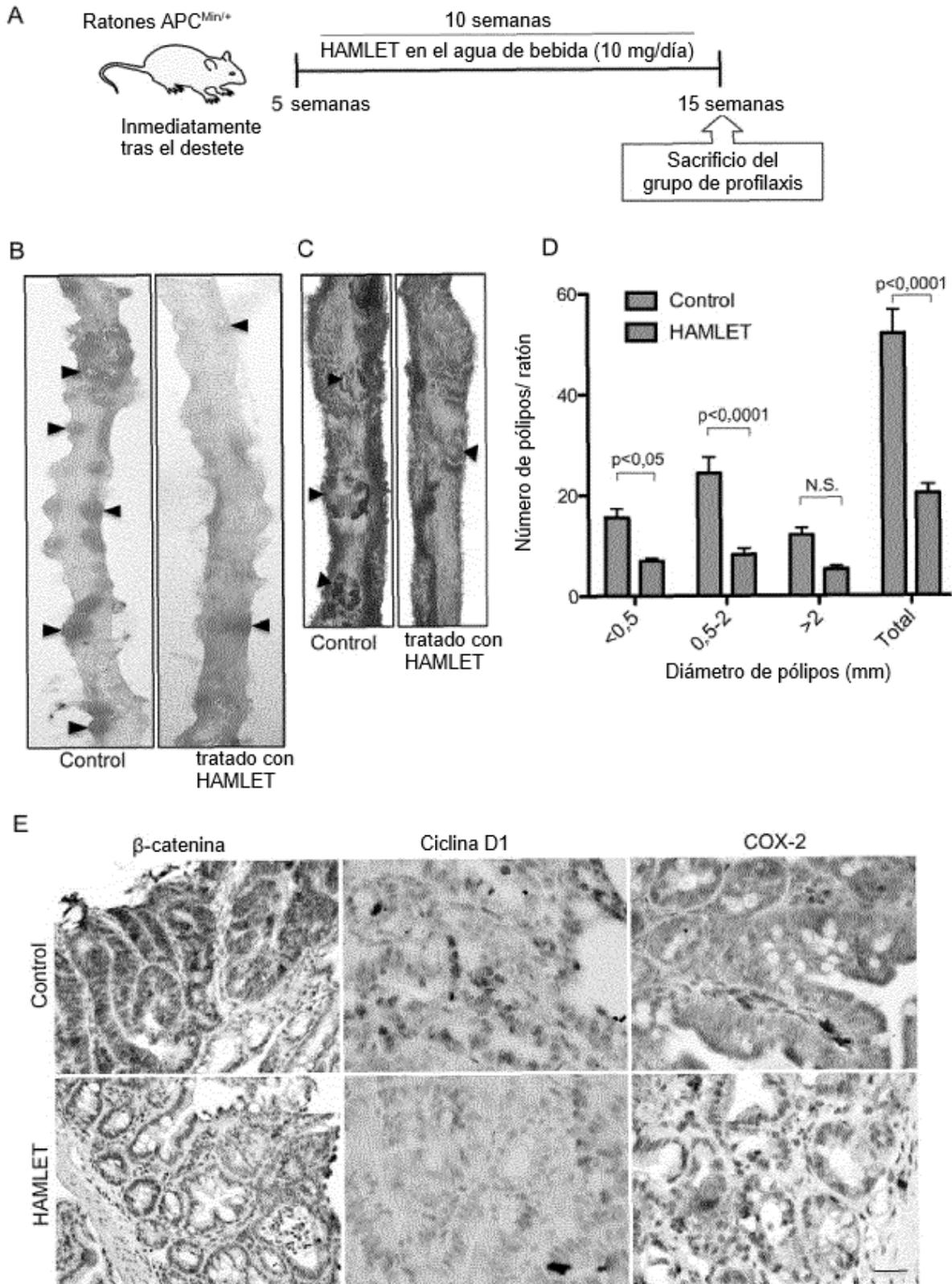


Figura 7

Régimen de tratamiento

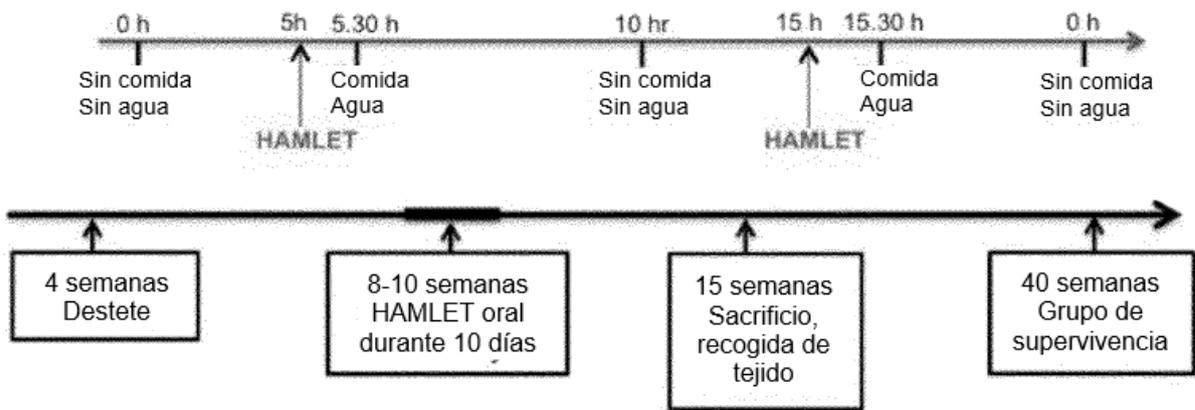


Figura 8

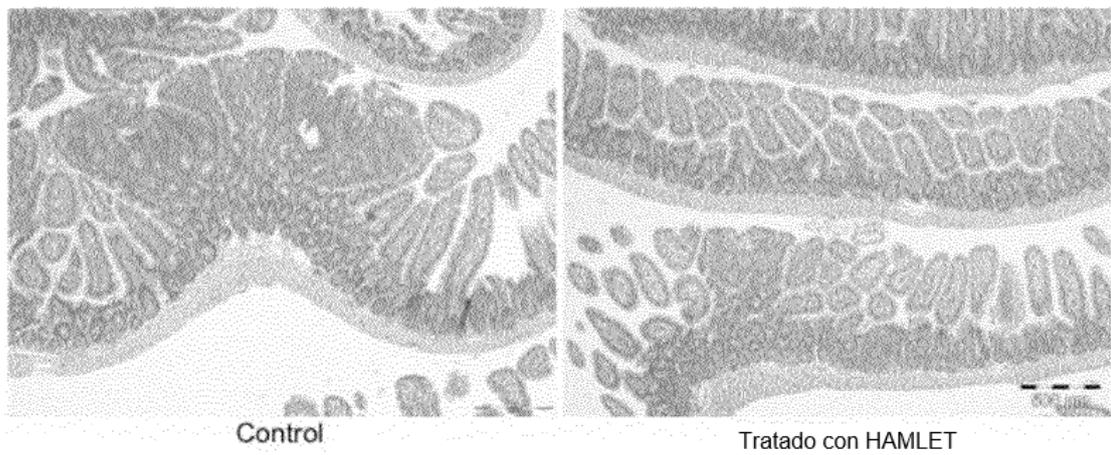


Figura 9

Rutas enriquecidas en tumores tratados control en comparación con tratadas con HAMLET

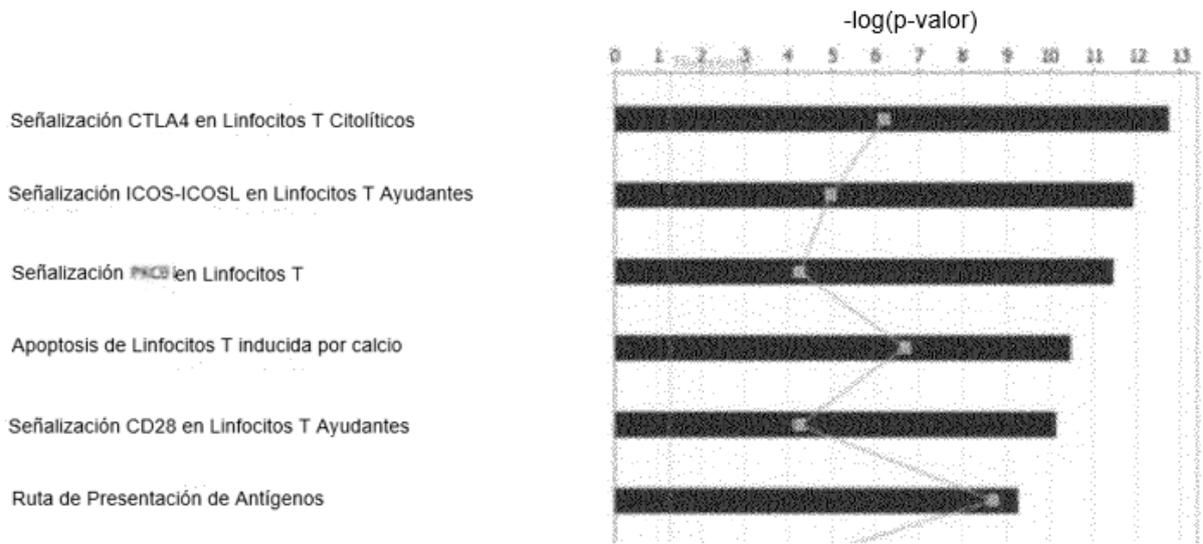


Figura 10

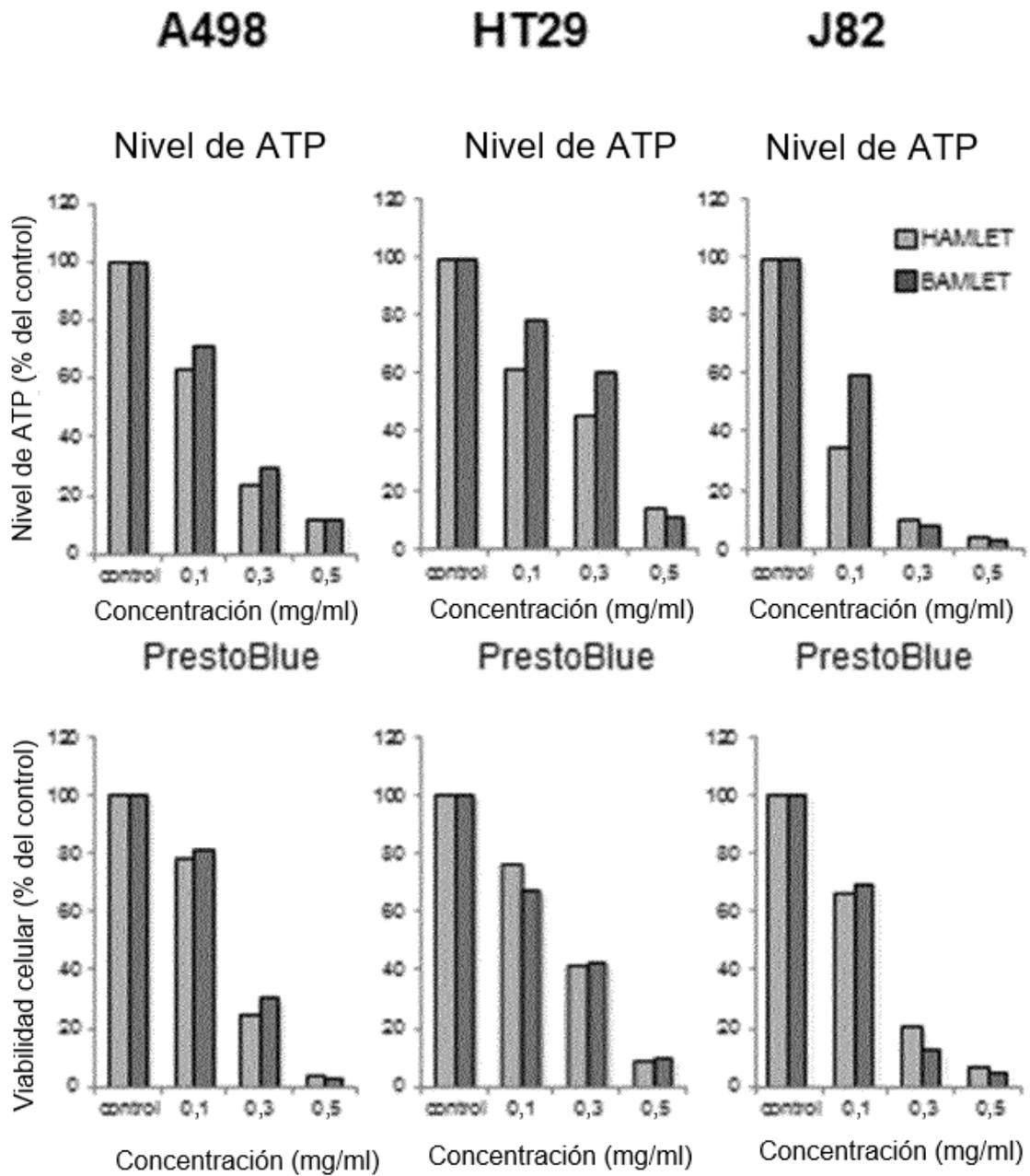


Figura 11

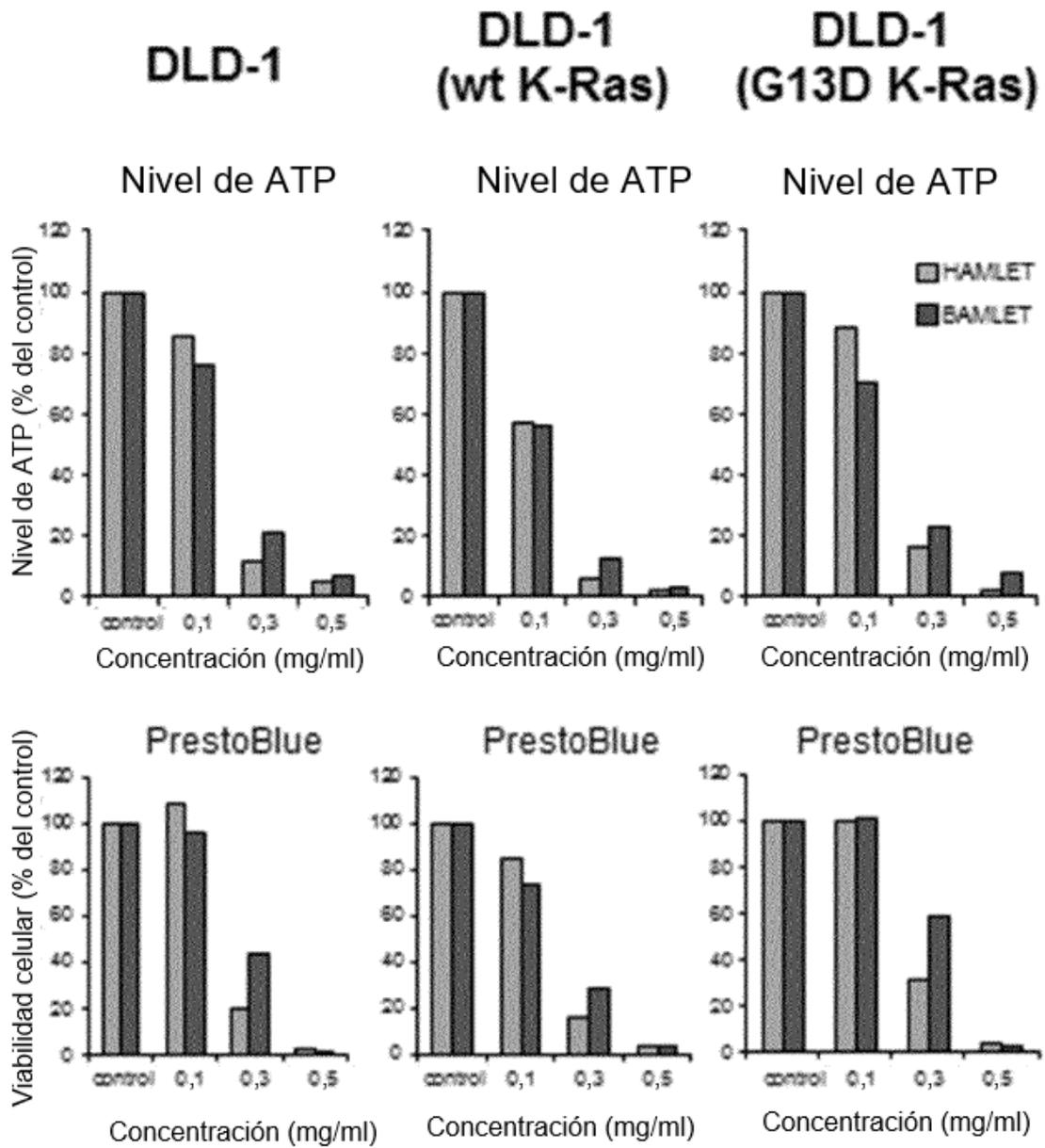


Figura 12

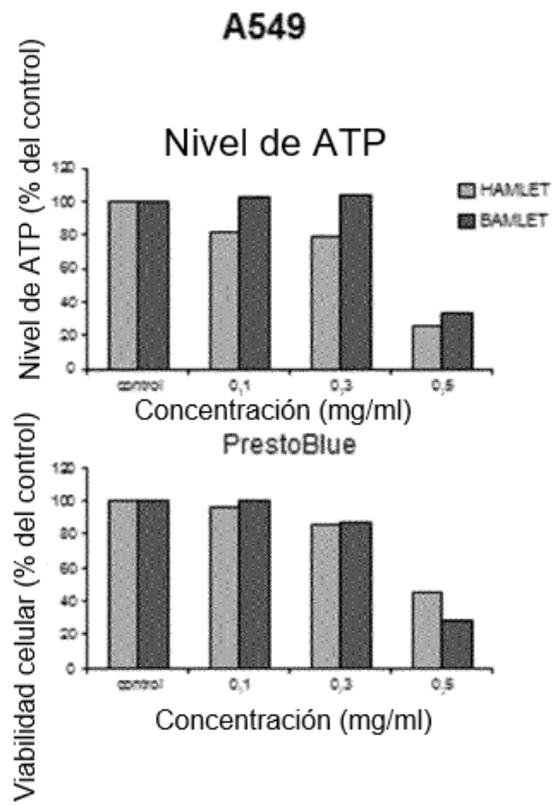


Figura 13

