

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 377**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61K 38/54** (2006.01)  
**A61K 31/095** (2006.01)  
**A61K 31/21** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 16174383 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3095458**

54 Título: **Composición farmacéutica para tratar el cáncer que comprende tripsinógeno y quimotripsinógeno**

30 Prioridad:

**22.10.2009 AU 2009905147**  
**17.06.2010 AU 2010902655**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.12.2018**

73 Titular/es:

**PROPANC PTY LTD (100.0%)**  
**576 Swan Street**  
**Richmond, Victoria 3121, AU**

72 Inventor/es:

**KENYON, JULIAN NORMAN;**  
**CLAYTON, PAUL RODNEY;**  
**TOSH, DAVID;**  
**FELQUER, FERNANDO y**  
**BRANDT, RALF**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 692 377 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**

Composición farmacéutica para tratar el cáncer que comprende tripsinógeno y quimotripsinógeno

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general a composiciones farmacéuticas que contienen una proenzima proteasa y a su uso para tratar el cáncer.

**Antecedentes de la invención**

10 La idea de usar proteasas para tratar el cáncer ha existido durante más de 100 años. En 1905, John Beard propuso el uso de extractos de enzimas pancreáticas recién preparadas como una posible terapia contra el cáncer y realizó experimentos exitosos con el modelo del sarcoma de ratón de Jersén. Después de inyectarle al ratón la enzima proteasa tripsina, se observó una regresión de los tumores. Los resultados obtenidos por Beard produjeron un gran interés en ese momento, y los extractos de enzimas en bruto preparados a partir del páncreas de oveja se utilizaron para tratar a pacientes humanos con cáncer para reducir la progresión de su tumor y prolongar el tiempo de supervivencia.

15 Más recientemente, se ha demostrado que la administración oral de enzimas es bien tolerada por los pacientes con buenas tasas de supervivencia en una variedad de cánceres, incluidos los mielomas pancreáticos, intestinales, colorrectales y en etapa tardía. Se ha requerido el uso de altas dosis de enzimas debido a la pérdida e inactivación a través de la digestión y de otras enzimas inactivadoras en el plasma sanguíneo, como las serpinas.

20 El uso de proenzimas (forma de enzimas precursoras inactivas) se ha utilizado para superar los problemas encontrados con la administración oral de enzimas. Una mezcla de proenzimas que incluye el tripsinógeno, que es la forma proenzima de la tripsina inhibidora de la serina proteasa, ha demostrado que es útil en el tratamiento de carcinomas y se cree que se activa selectivamente en la superficie de las células tumorales (Novak J y Trmka F, Proenzyme Therapy of Cancer, Anticancer Research, 25: 1157-1178, 2005; Patente de Estados Unidos N° 5.858.357). Se cree que el mecanismo de acción de la tripsina se produce a través de la proteólisis de las células tumorales.

25 Existe la necesidad de identificar y proporcionar composiciones de proenzimas mejoradas que sean eficaces para tratar los cánceres.

**Compendio**

30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una primera y una segunda proenzima proteasa capaz de activarse en la superficie, o cerca de ésta, de una célula tumoral para mejorar la adhesión célula a célula de las células tumorales, efectuar la proteólisis de las células tumorales o inducir la apoptosis de las células tumorales, la diferenciación o el inmunoreconocimiento, en donde la primera proenzima proteasa es un quimotripsinógeno y la segunda proenzima proteasa es un tripsinógeno, y la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está en el intervalo de 4:1 a 8:1.

35 En una realización de la invención, la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está en el intervalo de entre 5:1 a 7:1. En otra realización, la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno es 6:1.

La invención se refiere además al uso de esta composición en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

Una primera descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una proenzima proteasa y un agente activo, siendo la composición capaz de proporcionar un enfoque multifuncional para tratar el cáncer.

40 Una segunda descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende:

una proenzima proteasa capaz de activarse en la superficie, o cerca de ésta, de una célula tumoral para mejorar la adhesión de célula a célula de las células tumorales, efectuar la proteólisis de las células tumorales o inducir la apoptosis de las células tumorales, la diferenciación o el inmunoreconocimiento y

un agente activo capaz de inducir actividad intracelular en las células tumorales.

45 En una realización de la segunda descripción, la actividad intracelular es la apoptosis de las células tumorales, el inmunoreconocimiento o la diferenciación.

50 En una realización de la primera o segunda descripción, la composición farmacéutica comprende una proenzima proteasa y un agente activo, siendo la composición capaz de proporcionar un enfoque multifuncional para tratar el cáncer, en el que la proenzima proteasa se selecciona de al menos uno de tripsinógeno y quimotripsinógeno, y el agente activo se selecciona de al menos uno de entre un compuesto de selenio, un compuesto vaniloide y un agente de reducción de la glucólisis citoplásmica y, opcionalmente, una glucósido hidrolasa. En una realización adicional, la

proenzima proteasa es el tripsinógeno y el quimotripsinógeno.

Una tercera descripción proporciona un agente o composición para tratar el cáncer, en el que el agente comprende una proenzima proteasa y un agente activo, que juntos son capaces de proporcionar un enfoque multifuncional para tratar el cáncer.

- 5 Una cuarta descripción proporciona un agente o una composición para tratar el cáncer, en el que el agente comprende:

una proenzima proteasa capaz de activarse en la superficie, o cerca de ésta, de una célula tumoral para mejorar la adhesión de célula a célula de las células tumorales, efectuar la proteólisis de células tumorales o inducir la apoptosis, la diferenciación o el inmunorreconocimiento de las células tumorales; y

- 10 un agente activo capaz de inducir actividad intracelular en células tumorales.

Una quinta descripción proporciona el uso de una proenzima proteasa en la fabricación de un medicamento que comprende un agente activo para tratar el cáncer.

Una sexta descripción proporciona el uso de un agente activo en la fabricación de un medicamento que comprende una proenzima proteasa para tratar el cáncer.

- 15 Una séptima descripción proporciona el uso de una proenzima proteasa y un agente activo en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

Una octava descripción proporciona el uso de una proenzima proteasa en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto que está siendo tratado con un agente activo, en donde el agente activo y la proenzima proteasa juntos pueden producir células tumorales y, opcionalmente, en donde el agente activo es capaz de inducir la actividad intracelular para mejorar el efecto de la proenzima proteasa.

- 20

Una novena descripción proporciona el uso de un agente activo en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto que está siendo tratado con una proenzima proteasa, en donde el agente activo y la proenzima proteasa juntos pueden producir células tumorales y, opcionalmente, en donde el agente activo es capaz de inducir la actividad intracelular para mejorar el efecto de la proenzima proteasa.

- 25 Una décima descripción proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proenzima proteasa y un agente activo.

En una realización de la décima descripción, el método comprende la administración conjunta o la administración secuencial de la proenzima proteasa y el agente activo y, opcionalmente, el agente activo adicional. La administración conjunta puede comprender la administración de un medicamento único que comprende la composición farmacéutica de la primera y segunda descripción, o la administración conjunta de medicamentos separados que comprenden cada uno una proenzima proteasa y el agente activo y, opcionalmente, un agente activo adicional. La administración secuencial puede implicar cualquier orden de administración de la proenzima proteasa, el agente activo o el agente activo adicional. La secuencia y la administración conjunta pueden implicar diferentes vías de administración de la proenzima proteasa, el agente activo o el agente activo adicional.

- 30

- 35 El método de acuerdo con la décima descripción puede incluir la administración de la proenzima proteasa o el agente activo a un sujeto que ya ha sido tratado por separado con el agente activo o la proenzima proteasa, respectivamente.

Una undécima descripción proporciona un método para preparar la composición farmacéutica de la primera y segunda descripciones, o la preparación o formulación de éstas, mezclando la proenzima proteasa con el agente activo.

- 40

En una realización adicional de la undécima descripción, el método puede comprender además la mezcla de un agente activo adicional de acuerdo con una realización de la primera y segunda descripción con las proenzimas de proteasa y/o el agente activo.

En una realización de las descripciones anteriores, la proenzima proteasa es una proenzima serina proteasa. La proenzima serina proteasa puede ser tripsinógeno, quimotripsinógeno o una mezcla de estos. En otra realización, la proenzima proteasa comprende una primera proenzima proteasa y una segunda, en donde la primera proenzima proteasa es un quimotripsinógeno y la segunda proenzima proteasa es un tripsinógeno, y la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está en el intervalo de 4:1 a 8:1. En una realización adicional, la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está en el intervalo de entre 5:1 a 7:1. En una realización adicional, la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno es 6:1.

- 50

En una realización de las descripciones anteriores, el agente activo se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en un compuesto de selenio, un compuesto vaniloide y un agente reductor de la glicolisis citoplasmática y, opcionalmente, una glucósido hidrolasa. Por ejemplo, el agente activo puede ser un compuesto de selenio o una

combinación que consiste en un compuesto de selenio, un compuesto vaniloide, una glucósido hidrolasa y un agente reductor de la glucólisis citoplásmica.

5 En una realización de las descripciones anteriores, la composición farmacéutica comprende una proenzima proteasa y un agente activo, siendo la composición capaz de proporcionar un enfoque funcional para tratar el cáncer, en el que la proenzima proteasa se selecciona de al menos uno de tripsinógeno y quimotripsinógeno, y el agente activo se selecciona de al menos uno de un compuesto de selenio, un compuesto vaniloide y un agente de reducción de la glicólisis citoplásmica y, opcionalmente, una glucósido hidrolasa.

10 En una realización adicional de las descripciones anteriores, el compuesto de selenio es capaz de proporcionar una fuente biodisponible de selenio que puede ser absorbida por el cuerpo en el plasma sanguíneo o los fluidos intercelulares. En una realización particular, el compuesto que contiene selenio es metilselenocisteína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En una realización de los aspectos anteriores, la glucósido hidrolasa es una amilasa, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa.

En otra realización de las descripciones anteriores, el agente reductor de la glicólisis citoplásmica es la 2-desoxi-D-glucosa.

15 En otra realización de las descripciones anteriores, el compuesto vaniloide se selecciona de capsato, a saber, 4-hidroxi-3-metoxibencil (E)-8-metil-6-nonenoato, dihidrocapsato, a saber 8-metilonanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo, y nordihrocapsato, a saber, 7-metiloctanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo. Preferiblemente, el compuesto vaniloide es el capsato. En una realización de las descripciones anteriores, el agente activo se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en metilselenocisteína, capsato,  $\alpha$ -amilasa y 2-desoxi-D-glucosa. En una realización particular, el(los) agente(s) activo(s) consiste(n) en metilselenocisteína, capsato,  $\alpha$ -amilasa y 2-desoxi-D-glucosa.

20

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica comprende además un agente activo tal como se define en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

25 Una duodécima descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un primer y segundo agente activo, cada uno capaz de inducir actividad intracelular en células tumorales, en el que el primer agente activo es un compuesto de selenio y el segundo agente activo es un agente de reducción de la glucólisis citoplasmática.

30 En una realización de la duodécima descripción, la actividad intracelular es la apoptosis de células tumorales, el inmunorreconocimiento o la diferenciación. En una realización, el compuesto de selenio se define de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En una realización preferida, el compuesto de selenio es metilselenocisteína. En otra realización, el agente de reducción de la glucólisis citoplásmica es la 2-desoxi-D-glucosa.

35 En otra realización de la duodécima descripción, la composición farmacéutica comprende además una proenzima proteasa como se define en una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. En otra realización de la duodécima descripción, la composición farmacéutica comprende además un agente activo seleccionado de un compuesto vaniloide y una glicosida hidrolasa como se define en una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

Una decimotercera descripción proporciona un uso de la composición farmacéutica de acuerdo con la undécima o duodécima descripciones en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

40 Una decimocuarta descripción proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la undécima o duodécima descripción.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden proporcionarse en un vehículo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, y pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

45 En una realización adicional de las descripciones anteriores, las composiciones farmacéuticas, los agentes, el uso o los métodos pueden comprender uno o más agentes activos adicionales capaces de mejorar la eficacia de la proenzima proteasa, el agente activo o las composiciones farmacéuticas, o reducir los efectos secundarios indeseables.

50 En una realización adicional de las descripciones anteriores, la composición farmacéutica, la proenzima proteasa, el agente activo y el agente activo opcionalmente adicional, pueden proporcionarse juntos, por separado o en cualquier combinación, en forma de un supositorio.

### Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-D muestran cada una gráfica de las curvas estándar del número de células para las células Caco2, HEK293, OE33 y Panc1, respectivamente, con una densidad óptica de 492 nm;

- La figura 2 muestra una fotomicrografía de células OE33 tratadas con una formulación de referencia de proenzima B;
- La figura 3 muestra una gráfica de células OE33 tratadas con un intervalo de concentraciones de la formulación de referencia de la proenzima B;
- 5 Las figuras 4A-C muestran cada una gráfica de células Panc1 tratadas con las formulaciones de referencia de proenzima B, J y T, respectivamente;
- Las figuras 5A-C muestran cada una gráfica de células Caco2 tratadas con formulaciones de referencia de proenzima B, J y T, respectivamente;
- 10 Las figuras 6A y 6B proporcionan, cada una, fotomicrografías que muestran la regulación al alza de la  $\beta$ -catenina en células OE33 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima J;
- Las figuras 7A y 7B proporcionan, cada una, fotomicrografías que muestran la regulación al alza de E-cadherina en células OE33 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima J;
- Las figuras 8A y 8B proporcionan, cada una, fotomicrografías que muestran la regulación al alza de la  $\beta$ -catenina en células Panc1 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima J;
- 15 Las figuras 9A y 9B proporcionan, cada una, fotomicrografías que muestran la regulación al alza de E-cadherina en células Panc1 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima J;
- Las figuras 10A y 10B proporcionan, cada una, fotomicrografías que muestran la regulación al alza de E-cadherina en células Caco2 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima J;
- 20 Las figuras 11A y 11B proporcionan, cada una, fotomicrografías que muestran la regulación al alza de la  $\beta$ -catenina en células Caco2 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima J;
- La figura 12 proporciona fotomicrografías que muestran la regulación al alza de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en células Panc1 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima T;
- La figura 13 proporciona fotomicrografías que muestran la regulación al alza de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en células Caco2 después del tratamiento con la formulación de referencia de proenzima T;
- 25 La figura 14 proporciona un análisis isoblográfico para JBp1vP y DCM en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- La figura 15 proporciona un análisis isoblográfico para tripsinógeno y quimotripsinógeno en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- La figura 16 proporciona un análisis isoblográfico para tripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- 30 La figura 17 proporciona un análisis isoblográfico para quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- La figura 18 proporciona un análisis isoblográfico para TA y quimotripsinógeno en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- La figura 19 proporciona un análisis isoblográfico para CA y tripsinógeno en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- 35 La figura 20 proporciona un análisis isoblográfico para TC y  $\alpha$ -amilasa en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2;
- La figura 21 proporciona un diagrama de barras que muestra los pesos medios de las cápsulas para diversas formulaciones de los Grupos 1 a 5 en un estudio comparativo in vivo anti-angiogénico de ratones equipados con cápsulas fibrosas;
- Las figuras 22A y 22B proporcionan un análisis isoblográfico para JBp1vP y metilselenocisteína en células HCT-15;
- 40 Las figuras 23A y 23B proporcionan un análisis isoblográfico para JBp1vP y 2-desoxiglucosa en células HCT-15;
- Las figuras 24A y 24B proporcionan un análisis isoblográfico para JBp1vP y capsiato en células HCT-15; y
- Las figuras 25A y 25B proporcionan un análisis isoblográfico para 2-desoxiglucosa y metilselenocisteína en células HCT-15.

**Descripción de las abreviaturas**

En los ejemplos, se hará referencia a las siguientes abreviaturas en las que:

	$\alpha$ -amilasa	A
	ANOVA	Análisis de varianza
5	Avg	Promedio
	bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
	BSA	Suero bovino de Albúmina
	BW	Peso corporal
	°C	Grados Celsius
10	C	Capsiato
	Caco2	Línea de células del adenocarcinoma de colon humano
	Quimotripsinógeno	pC
	DAvg	Cambio en el peso corporal promedio
	DCM	2-Desoxiglucosa, Capsiato y Metilselenocisteína
15	D	2-Desoxi-D-glucosa
	F	Fahrenheit
	h	Hora
	Hb	Hemoglobina
	i.p.	intraperitoneal
20	IU	Unidades internacionales
	JBp1	Formulación de proenzima que comprende tripsinógeno, quimotripsinógeno y $\alpha$ -amilasa
	JBp1vP	Formulación de proenzima que comprende tripsinógeno, quimotripsinógeno y $\alpha$ -amilasa (pC:pT:A) en 6:1:0,25 en relación en peso.
25	JBp1-DCM	Formulación de proenzima que comprende quimotripsinógeno, $\alpha$ -amilasa, 2-desoxiglucosa, capsiao y metilselenocisteína
	Mn	Peso molecular promedio en número
	Mw	Peso molecular promedio en peso
	MW	Peso molecular
	M	Metilselenocisteína
30	MSeA	Ácido metilselénico
	MTD	Máxima dosis tolerable
	NMP	N-metil-2-pirrolidona
	OE33	Línea celular de adenocarcinoma esofágico
	Panc1	Línea celular de carcinoma ductal pancreático humano
35	PBS	Solución fosfatada con fosfato
	PEG300	Polietilenglicol 300
	p.o.	Per os, (sonda oral)

	RD	Dosis recomendada
	SeMeT	Selenometionina
	SEM	Error estándar de la media
	SRB	Ensayo de tinción de la proteína con sulforodamina B
5	Tripsinógeno	pT
	% en peso	Porcentaje en peso
	v/v	Volumen por volumen

**Descripción detallada**

10 Aunque se ha demostrado que las formulaciones de proenzima de proteasa proporcionan beneficios terapéuticos en el tratamiento del cáncer, el mecanismo de acción de las proenzimas de proteasa en células cancerosas y tumores malignos no se conoce completamente en la técnica. Por lo tanto, el solicitante realizó una investigación de los efectos y mecanismos implicados en el tratamiento de líneas celulares de cáncer con formulaciones de proenzimas de serina proteasa que comprenden tripsinógeno y quimotripsinógeno, que incluyeron investigaciones en tres líneas celulares de cáncer diferentes (Panc1, Caco2 y OE33). De particular interés fue el sorprendente descubrimiento de 15 que las proenzimas proteasas estaban involucradas en la diferenciación de las células tumorales de CaCo2 (posible conversión de células malignas en células no malignas) y en la regulación positiva de la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina en todas las tres líneas celulares.

20 El solicitante cree que una reducción en la metástasis por las formulaciones de proenzima de serina proteasa surge a través de la regulación positiva de la expresión y formación de complejos de E-cadherina/ $\beta$ -catenina, que están implicados en la adhesión de célula a célula. El corolario del aumento de la adhesión de célula a célula es una reducción de la metástasis porque es menos probable que las células malignas se difundan o escapen del tumor primario.

25 Con la disponibilidad de esta nueva información, la presente descripción investigó formulaciones que comprendían una proenzima proteasa en combinación con uno o más agentes activos que eran capaces de proporcionar una interrelación funcional en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el agente activo puede proporcionar una actividad mejorada para el tratamiento del cáncer a la pro-enzima sola operando en una función diferente de la célula tumoral con respecto a la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina, pero donde el resultado general es proporcionar un tratamiento mejorado, que puede incluir una reducción en la metástasis y/o un aumento en la apoptosis, 30 inmunoreconocimiento o diferenciación de la célula tumoral. En otras palabras, las composiciones farmacéuticas de la primera y segunda descripción proporcionan una proenzima proteasa en combinación con un agente activo, permitiendo la combinación un enfoque multicelular o multifuncional para dirigir o tratar una célula o células cancerosas. Por ejemplo, las proenzimas se activan en la superficie de la célula tumoral, o cerca de ésta, para promover la expresión de moléculas de adhesión célula a célula y, por lo tanto, reducir la metástasis, mientras que un agente activo separado, como la metilselenocisteína, puede funcionar a un nivel intracelular para ayudar con la 35 reducción de la metástasis, diferenciación o muerte de la célula tumoral (p. ej., necrosis, apoptosis, inmunoreconocimiento).

Proenzimas proteasas

40 Una proenzima (también conocida como zimógeno) es una forma precursora de una enzima que no tiene la actividad específica de la enzima y, por lo tanto, se denomina típicamente una forma inactiva de la enzima. Las proenzimas se mantienen en su estado inactivo hasta que se requieren, de modo que evitan o reducen los efectos no específicos de la actividad enzimática en sitios no deseados. Las proenzimas pueden activarse en las enzimas activas correspondientes mediante otras enzimas dando como resultado una cascada de activación, que incluye la acción de múltiples enzimas y la autoactivación. Las proenzimas se consideran activadas selectivamente por las células cancerosas que, a su vez, están sometidas a la proteólisis por la enzima activa.

45 La expresión "proenzima proteasa", como se usa en este documento, significa una forma precursora de una enzima proteasa que puede activarse in situ en la enzima proteasa activa. Las proenzimas proteasas pueden ser de origen humano o animal. La enzima proteasa puede actuar para proporcionar uno o más efectos celulares que incluyen la proteólisis, la regulación positiva de la expresión de E-cadherina y/o  $\beta$ -catenina, la apoptosis, el inmunoreconocimiento potenciado y la diferenciación de las células tumorales. Las enzimas proteasas incluyen 50 serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, metaloproteasas o proteasas de ácido glutámico. Las proteasas pueden ser endopeptidasas o exopeptidasas. Las endopeptidasas (o endoproteinasas) son peptidasas proteolíticas que rompen los enlaces peptídicos de los aminoácidos no terminales (es decir, dentro de la molécula), a diferencia de las exopeptidasas, que rompen los enlaces peptídicos en los extremos de la molécula.

La proenzima proteasa puede ser un precursor de una enzima a partir de peptidasas de la clase enzimática 3.4,

particularmente serina endopeptidasas de la clase enzimática 3.4.21 y, más particularmente, quimotripsina de la clase enzimática 3.4.21.1, quimotripsina C de la enzima 3.4.21.2 o tripsina de la clase de enzimas 3.4.21.4 (clases agrupadas según la clasificación del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular).

- 5 La proenzima proteasa puede ser una proenzima serina proteasa. Las enzimas de la serina proteasa incluyen las formas de tipo tripsina o quimotripsina, tipo subtilisina, alfa/beta hidrolasa y peptidasas señal. Las serina proteasas pueden incluir las siguientes serina endopeptidasas: quimotripsina, metridina, tripsina, trombina, factor de coagulación Xa, plasmina, enteropeptidasa, acrosina, endopeptidasa  $\alpha$ -Lítica, glutamil endopeptidasa, catepsina G, factor de coagulación VIIa, factor de coagulación IXa, cucumisina, prolil oligopeptidasa, factor de coagulación Xia, braquiurano, calicreína de plasma, calicreína de tejido, elastasa pancreática, elastasa de leucocitos, factor de coagulación XIIa, quimasa, complemento activado C1r, complemento activado C1s, convertasa C3/C5 de la ruta del complemento clásico, factor I del complemento, factor D del complemento, convertasa C3/C5 de la ruta del complemento alternativo, cerevisina, hipodermina C, lisil endopeptidasa, endopeptidasa La,  $\gamma$ -renina, venombin AB, leucil endopeptidasa triptasa, escutelarina, quexina, subtilización, orizina, peptidasa K, termomicolina, termitasa, endopeptidasa So, activador t-plasminógeno, proteína C (activada), endopeptidasa pancreática E, elastasa pancreática II, serina endopeptidasa específica de IgA, activador de u-plasminógeno, venombina A, furina, mieloblastina, semenogelasa, granzima A, granzima B, estreptogrisina A, estreptogrisina B, glutamil endopeptidasa II, oligopeptidasa B, factor de coagulación C del limulus, factor de coagulación del limulus B, enzima de coagulación del limulus, represor LexA, peptidasa I de señal, togavirina, flavivirina, endopeptidasa Clp, proproteína convertasa 1, proproteína convertasa 2, activador del factor V de veneno de serpiente, lactocepina, ensamblaje, hepacivirina, espermosina, sedolisina, xantomonalisina, peptidasa de procesamiento C-terminal, fisarolisina, serina proteasa-2 asociada a lectina de unión a manano, proteasa romboidal, hepsina, peptidasa Do, HtrA2 peptidasa, matriptasa, C5a peptidasa, aqualisina 1, sitio-1 proteasa, poliproteína peptidasa de pestivirus NS3, serina peptidasa de arterivirus equino, birnavirus vp4 peptidasa de necrosis pancreática infecciosa, spoIVB peptidasa, enzima quimotriptica del estrato córneo, calicreína 8, calicreína 13, oviductina.

La proenzima serina proteasa de la presente invención es una mezcla de tripsinógeno y quimotripsinógeno.

Las proenzimas tripsinógeno y quimotripsinógeno pueden ser precursoras de las enzimas seleccionadas a partir de las clases de quimotripsina 3.4.21.1 o 3.4.21.2 o tripsina de la clase 3.4.21.4, o seleccionadas de cualquier otra fuente adecuada. Estas enzimas están disponibles comercialmente y pueden ser de origen bovino o porcino.

- 30 El quimotripsinógeno es una forma proenzimática de la enzima quimotripsina, que escinde preferentemente proteínas en los siguientes aminoácidos: tirosina, triptófano, fenilalanina y leucina. La quimotripsina puede referirse o incluir quimotripsina A, quimotripsina B (incluidas las formas B1 y B2), quimotripsina C,  $\alpha$ -quimar oft, avazima, quimara, quimotest, enzeon, quimar, quimotrasa,  $\alpha$ -quimotripsina A,  $\alpha$ -quimotripsina. La quimotripsina C puede formarse a partir de quimotripsinógeno C de cerdo o de la subunidad II de procarboxipeptidasa A de ganado vacuno, y preferentemente escinde proteínas en los siguientes aminoácidos: tirosina, triptófano, fenilalanina, leucina, metionina, glutamina y asparagina. El quimotripsinógeno incluye al quimotripsinógeno B1 y al quimotripsinógeno B2.

- 40 El tripsinógeno es una forma proenzimática de la tripsina, que escinde preferentemente proteínas en arginina y lisina. La tripsina puede referirse o incluir a  $\alpha$ -tripsina,  $\beta$ -tripsina, cocoonasa, parenzima, parenzimol, triptar, tripuro, pseudotripsina, triptasa, tripcelim, hidrolasa receptora de esperma  $\beta$ -tripsina puede formarse a partir de tripsinógeno por escisión de un enlace peptídico. Otras escisiones de enlaces peptídicos producen formas  $\alpha$  y otras iso-formas. Se pueden aislar múltiples tripsinas catiónicas y aniónicas del páncreas de muchos vertebrados y de especies inferiores, como cangrejos de río, insectos (cocoonasa) y microorganismos (*Streptomyces griseus*). En los procesos normales durante la digestión, el tripsinógeno inactivo se activa por la enteropeptidasa presente en la mucosa intestinal para formar la enzima tripsina, que es una serina proteasa que luego actúa para romper los enlaces peptídicos en el lado carboxilo de los aminoácidos/proteínas básicos.

- 45 Como se mencionó, la forma de proenzima proporciona esencialmente una forma inactivada de la enzima que se activa in situ (por ejemplo, la activación in vivo o in vitro). Por ejemplo, la activación de la proenzima (conversión de proenzima en enzima activa) puede ocurrir en contacto con la superficie de la célula tumoral. Se cree que las proenzimas tripsinógeno y quimotripsinógeno se activan selectivamente en las enzimas tripsina y quimotripsina en contacto con células tumorales y no en contacto con células sanas. El uso de proenzimas reduce los problemas asociados con el suministro in situ de una enzima activa, como reacciones indeseables o la inactivación de la enzima antes de alcanzar el objetivo deseado de una célula tumoral.

- 55 En relación con las células tumorales, las enzimas proteasas pueden actuar para romper la pared celular de las células malignas al dividir los enlaces amida presentes en las cadenas peptídicas de las paredes celulares (proteólisis). También se entiende que los inhibidores de la proteasa, que están presentes en las células no malignas e inhiben o reducen el efecto de las enzimas en la descomposición de las paredes celulares, están ausentes en las células tumorales malignas. Además de proporcionar actividad proteolítica, las proenzimas de proteasa pueden regular al alza la expresión de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en las células tumorales. La adhesión célula a célula se facilita mediante la formación de complejos o la unión entre  $\beta$ -catenina y E-cadherina en la superficie celular y, por lo tanto, una mayor expresión de  $\beta$ -catenina y E-cadherina conduce a una mayor adhesión de célula a célula y, por lo

tanto, reduce la metástasis de las células tumorales. Las proenzimas de proteasa también pueden proporcionar otra actividad celular, como un aumento del inmunoreconocimiento o de la diferenciación.

Agentes activos

5 Los agentes activos de la primera descripción, segunda descripción, duodécima descripción y la invención son para tratar el cáncer o inducir la actividad intracelular para mejorar el tratamiento de una célula tumoral.

En una realización, la actividad intracelular es la apoptosis de células tumorales, necrosis, inmunoreconocimiento o diferenciación.

10 En relación con el enfoque multifuncional, en una realización, los agentes activos son capaces de proporcionar una interrelación funcional con las proenzimas proteasas en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el agente activo puede proporcionar una actividad mejorada para el tratamiento del cáncer que puede o no estar relacionada con la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina, pero donde el resultado general es proporcionar un tratamiento mejorado, como una reducción de la metástasis y/o un aumento de la apoptosis, el inmunoreconocimiento o la diferenciación de la célula tumoral. El agente activo puede operar a nivel intracelular para ayudar con la reducción de la metástasis, la diferenciación o la muerte de la célula tumoral (por ejemplo, necrosis, apoptosis, inmunoreconocimiento).

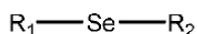
15 En una realización, el agente activo se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en un compuesto de selenio, un compuesto vaniloide y un agente de reducción de la glucólisis citoplásmica y, opcionalmente, una glucósido hidrolasa. Por ejemplo, el agente activo puede consistir en un compuesto de selenio, o puede ser una combinación de agentes activos que consiste en un compuesto de selenio, un compuesto vaniloide, una glucósido hidrolasa y un agente de reducción de la glucólisis citoplásmica.

20 Compuesto de selenio

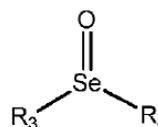
25 En una realización, la expresión "compuesto de selenio" significa cualquier compuesto que contenga selenio que sea capaz de proporcionar una fuente biodisponible de selenio. El compuesto de selenio puede incluir compuestos inorgánicos, tales como minerales que contienen selenitos y selenatos, y compuestos orgánicos, tales como la metilselenocisteína. El compuesto de selenio se puede obtener como un extracto vegetal o de una síntesis comercial. En una realización particular, el compuesto de selenio proporciona una fuente biodisponible de selenio que puede ser fácilmente absorbida por el cuerpo en el plasma sanguíneo o los fluidos intercelulares.

30 En una realización, la expresión "compuesto de selenio" significa un aminoácido que contiene un compuesto de selenio divalente o tetravalente. El aminoácido puede seleccionarse de isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, aspartato, metionina, cisteína, fenilalanina, glutamato, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, histidina. El selenio divalente o tetravalente también puede estar presente en el aminoácido en sustitución del azufre u otras especies divalentes que puedan aparecer de forma natural en estos aminoácidos.

En una realización, la expresión "compuesto de selenio" significa un compuesto que contiene un compuesto de selenio divalente de fórmula I o un compuesto de selenio tetravalente de fórmula II:



Fórmula I



Fórmula II

35 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, OH, -C(O)H, -C(O)OH, -C(O)-OR<sub>5</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub> y alquenilo C<sub>2-6</sub>, en donde alquilo C<sub>1-4</sub> y alquenilo C<sub>2-6</sub> están opcionalmente sustituidos con 0-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, OH, -NH<sub>2</sub>, -C(O)OH, -C(O)-OR<sub>5</sub>;

40 R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, OH, -C(O)H, -C(O)OH, -C(O)-OR<sub>5</sub>, alquilo C<sub>1-12</sub> y alquenilo C<sub>2-12</sub>, en donde alquilo C<sub>1-12</sub> y alquenilo C<sub>2-12</sub> se interrumpen opcionalmente con uno o más grupos seleccionados entre -NH-, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)-, -NH(CO)-, -C(O)-, -C(O)O-, -O- y -C(NH<sub>2</sub>)H-C(O)O-, y opcionalmente sustituido con 0-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, -NH<sub>2</sub>, -OH, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -C(O)OH, -C(O)H, -C(O)-OR<sub>5</sub>, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)H, -N(alquilo C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -C(NH<sub>2</sub>)H-C(O)OH, cicloalquilo, cicloalquenilo y arilo; y

45 en donde R<sub>5</sub> se selecciona de alquilo, alquenilo, cicloalquilo y cicloalquenilo, particularmente alquilo C<sub>1-12</sub>.

En la realización anterior se apreciará que:

alquilo C<sub>1-4</sub> y alquilo C<sub>1-12</sub> significan una cadena de cicloalquilo lineal o ramificada, o una combinación de éstas; y

alqueno C<sub>2-6</sub> y alqueno C<sub>2-12</sub> significan una cadena de cicloalqueno lineal o ramificada, o una combinación de éstas.

- 5 En una realización particular, R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, OH y alquilo C<sub>1-4</sub>, y más particularmente son metilo.

En otra realización particular, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, OH y -alquil C<sub>1-6</sub>-C(NH<sub>2</sub>)H-C(O)OH y, más particularmente, -alquil C<sub>1-3</sub>-C(NH<sub>2</sub>)H-C(O)OH.

- 10 En otra realización, el compuesto de selenio se selecciona de metilselenocisteína, metilselenol y ácido metilselenínico, o una sal o mezcla farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una realización particular, el compuesto de selenio es metilselenocisteína o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 Los compuestos de selenio se seleccionan para mejorar la eficacia del tratamiento de las proenzimas de proteasa proporcionando una interrelación funcional o un enfoque multifuncional para tratar el cáncer. Por ejemplo, el compuesto de selenio puede inducir la actividad intracelular para mejorar el tratamiento de la célula tumoral por medio de la apoptosis de las células tumorales, el inmunoreconocimiento y/o la diferenciación.

- 20 La relación entre la ingesta de selenio y el cáncer se conoce desde hace décadas. El selenio es un oligoelemento esencial con una cantidad diaria recomendada (RDA) de 55 microgramos. El selenio es esencial para activar diversas enzimas clave, como la antioxidante glutatión peroxidasa, la enzima metabólica tioredoxina reductasa y la enzima activadora de la hormona tiroidea yodotironina deiodinasa. Se ha considerado que el selenio proporciona protección contra el cáncer mediante el aumento de la actividad antioxidante de las células y el hígado (glutatión peroxidasa) o mediante la promoción de la eliminación de carcinógenos ambientales (glutatión S-transferasa). Las formas orgánicas de selenio, como la selenometionina, pueden ser tóxicas a niveles de aproximadamente 3500 microgramos por día, mientras que las formas inorgánicas de selenio, como el selenito/selenato de sodio, pueden ser tóxicas en aproximadamente 1500 microgramos. El selenio es seguro en dosis a largo plazo en niveles de aproximadamente 400 µg/día, aunque los protocolos de tratamiento del cáncer pueden tratarse en intervalos de aproximadamente de 900 a 2.000 µg de selenio por día.

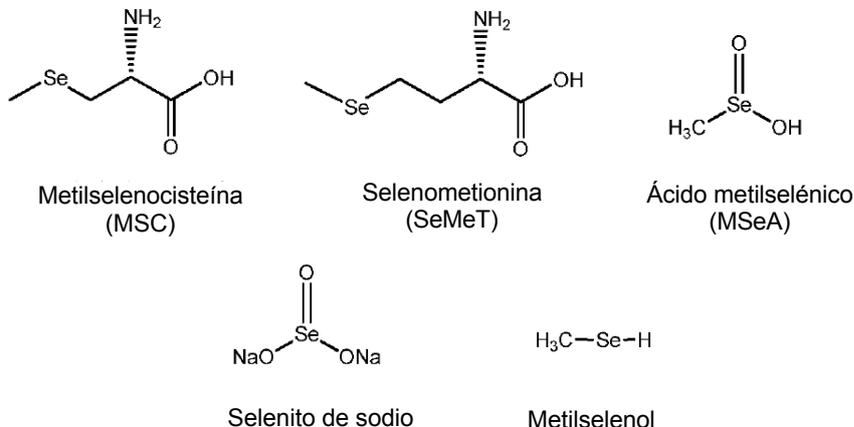
Se ha demostrado que algunos efectos anticancerígenos de selenio se producen en dosis cercanas a niveles de dosis potencialmente tóxicos, pero las enzimas selenoproteínas están generalmente saturadas (actividad máxima) en ingestas dietéticas de solo 90 µg de selenio por día, muy por debajo de las dosis óptimas contra el cáncer.

- 30 Las formas inorgánicas, como el selenito/selenato, han demostrado ser más efectivas para tratar el cáncer que las formas orgánicas típicas, como la selenometionina. Las formas de selenito/selenato se pueden metabolizar a seleniuro de hidrógeno, que es tóxico tanto para las células cancerosas como para las células sanas y funciona a través de un mecanismo de necrosis menos selectivo e invasivo (en oposición a la apoptosis). La selenometionina es menos tóxica, pero se incorpora en gran medida a las proteínas corporales generales que no tienen actividad anticancerígena.

- 40 La metilselenocisteína (también conocida como Se-metilselenocisteína) es un agente quimiopreventivo que bloquea la progresión del ciclo celular y la proliferación de lesiones mamarias premalignas, e induce la apoptosis de líneas celulares cancerígenas, con muy baja toxicidad y acumulación corporal. La metilselenocisteína se forma de forma natural en varias plantas, incluidos el ajo, los puerros silvestres, las cebollas y el brócoli cultivados en suelos con alto contenido en selenio, y los alimentos ricos en metilselenocisteína han demostrado una buena actividad anticancerígena, sin un exceso de acumulación en tejidos o toxicidad. La metilselenocisteína se convierte en metilselenol por la enzima beta-liasa. En cuanto a la actividad contra las células tumorales, se sabe que el metilselenol inhibe la angiogénesis y causa la apoptosis, pero tiene una toxicidad baja y el organismo la elimina fácilmente.

45

Las siguientes estructuras químicas representan diversos compuestos de selenio:

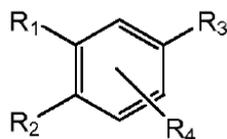


5 Los compuestos de selenio de acuerdo con las realizaciones anteriores pueden incluir todas las sales, hidratos, solvatos, formas cristalinas, diastereómeros, isómeros conformacionales (por ejemplo, isómeros cis y trans) farmacéuticamente aceptables, tautómeros, profármacos, metabolitos y formas enantioméricas de los mismos.

Compuesto vaniloide

10 En una realización, la expresión "compuesto vaniloide" se refiere a cualquier compuesto que contenga un resto de tipo vanililo o vaniloilo o farmacoro. Los compuestos vaniloides incluyen clases químicas conocidas de vaniloides naturales tales como resiniferanoides, capsaicinoides, dialdehídos insaturados y trifenilfenoles. Por ejemplo, los compuestos de estas clases químicas conocidas incluyen resiniferatoxina, capsaicina, isoveleral y escutigeral, respectivamente. Los ejemplos de otros compuestos vaniloides incluyen vainilina, ácido vanílico, nonivamida, olvanil, dihidrocapsaicina y ácido vanilil mandélico. Los compuestos vaniloides pueden incluir compuestos de origen natural, como la capsaicina o vaniloides semisintéticos o sintéticos, como la capsazepina.

En otra realización, la expresión "compuesto vaniloide" significa un compuesto de fórmula general III:



Fórmula III

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, OH, OCH<sub>3</sub>, C(O)H, O-alquilo C<sub>2-6</sub>, O-alqueno C<sub>2-6</sub>, SH, S-alquilo C<sub>1-6</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-alquilo C<sub>1-6</sub> y N(alquil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>;

20 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo C<sub>1-20</sub>, alqueno C<sub>2-20</sub> y alquino C<sub>2-20</sub>, en donde el alquilo C<sub>1-20</sub>, alqueno C<sub>2-20</sub> y alquino C<sub>2-20</sub> se interrumpen opcionalmente con uno o más grupos seleccionados de -NR<sub>6</sub>-, -NH(CO)-, -C(O)-, -C(O)O-, -O-, -C(NR<sub>6</sub>R<sub>6</sub>)H-C(O)O-, -C(S)-, -C(S)NR<sub>6</sub>- y -NR<sub>6</sub>-C(S)-NR<sub>6</sub>, y opcionalmente sustituidos con 0-3 sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, -NH<sub>2</sub>, -OH, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -C(O)OH, -C(O)OR<sub>5</sub>, -C(O)H, -N(alquil C<sub>1-4</sub>)H, -N(alquil C<sub>1-4</sub>)<sub>2</sub>, -C(NH<sub>2</sub>)H-C(O)OH, -C(S)-, cicloalquilo opcionalmente sustituido, cicloalqueno opcionalmente sustituido y arilo opcionalmente sustituido; y

25 en donde R<sub>5</sub> se selecciona de alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, particularmente alquilo C<sub>1-12</sub>; y R<sub>6</sub> se selecciona de H, alquilo C<sub>1-6</sub>; y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se pueden unir para formar un anillo insaturado opcionalmente sustituido o saturado que tiene de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo que incluye de 0 a 3 heteroátomos seleccionados de O, S y N.

30 En la realización anterior se apreciará que:

Alquilo C<sub>2-6</sub> y alquilo C<sub>1-20</sub> significan una cadena de cicloalquilo lineal o ramificada, o una combinación de éstas;

Alqueno C<sub>2-6</sub> y alqueno C<sub>2-20</sub> significan una cadena de cicloalqueno lineal o ramificada, o una combinación de éstas;

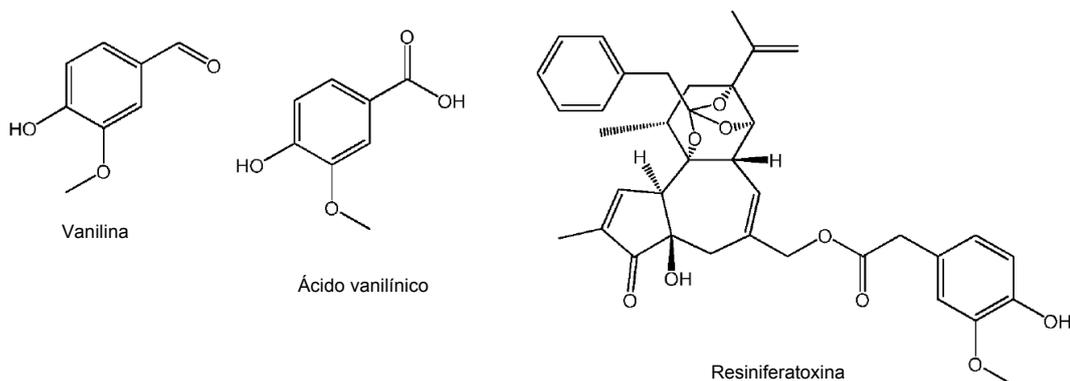
Alquino C<sub>2-20</sub> significa una cadena de cicloalquino lineal o ramificada, o una combinación de éstas;



Los capsiatos pueden producir apoptosis y reducir la incidencia de tumores. Se cree que los capsiatos inducen la apoptosis al afectar el estado redox de las células a través de las mitocondrias celulares.

- 5 Los compuestos vaniloideos se seleccionan para mejorar la eficacia del tratamiento de las proenzimas de proteasa al proporcionar una interrelación funcional o un enfoque multifuncional para tratar el cáncer. Por ejemplo, el compuesto vaniloide puede inducir una actividad intracelular que mejore el tratamiento de la célula tumoral mediante la apoptosis de las células tumorales, el inmunoreconocimiento y/o la diferenciación.

Las siguientes estructuras químicas para la vainilina, el ácido vanílico y la resiferatoxina son:



- 10 Los compuestos vaniloideos de acuerdo con las realizaciones anteriores pueden incluir todas las sales, hidratos, solvatos, formas cristalinas, diastereómeros, isómeros conformacionales (por ejemplo, isómeros cis y trans) farmacéuticamente aceptables, tautómeros, profármacos, metabolitos y formas enantioméricas de los mismos.

Glicósido hidrolasa

- 15 En una realización de la invención o de las descripciones, la expresión "glucósido hidrolasa" significa cualquier enzima que pueda hidrolizar el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y un resto no carbohidrato. La glucósido hidrolasa puede ser una enzima de la clase 3.2.1, particularmente una enzima de las clases 3.2.1.1 a 3.2.1.3. En una realización, la glucósido hidrolasa es una amilasa. La amilasa puede seleccionarse entre  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa, más particularmente amilasa 2, amilasa alfa 1A, amilasa alfa 1B, amilasa alfa 1C, amilasa alfa 2A, amilasa alfa 2B. En una realización, la amilasa es la  $\alpha$ -amilasa.

- 20 Las amilasas son glucósidos hidrolasas y actúan sobre los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos. Las amilasas descomponen los carbohidratos presentes en las glicoproteínas superficiales de las células tumorales. La amilasa se selecciona para mejorar la eficacia del tratamiento de las proenzimas de la proteasa proporcionando una interrelación funcional o un enfoque multifuncional para tratar el cáncer. La amilasa puede ser de origen humano, animal, bacteriano o vegetal. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa se puede obtener de cualquiera de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis*, malta de cebada, páncreas de cerdo, páncreas humano, páncreas porcino y *Triticum aestivum*.

- 25 Agente reductor de la glucólisis citoplásmica

En una realización, la expresión "agente de reducción de la glucólisis citoplásmica" significa un agente capaz de reducir la glucólisis citoplásmica. En otra realización, el agente de reducción de la glucólisis citoplásmica es la 2-desoxi-D-glucosa, o una sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

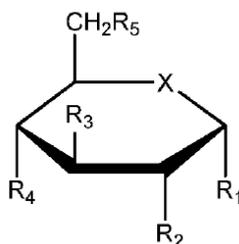
- 30 El agente de reducción de la glucólisis citoplásmica se selecciona para mejorar la eficacia del tratamiento de las proenzimas de proteasa al proporcionar una interrelación funcional o un enfoque multifuncional para tratar el cáncer.

El agente de reducción de la glucólisis citoplásmica puede ser un bloqueador o inhibidor de la glucólisis, por ejemplo, el oxamato, que es más específico para las células que metabolizan anaerómicamente y puede inhibir la deshidrogenasa láctica, o el yodoacetato, que puede inhibir la glucólisis en la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

- 35 Los inhibidores glucolíticos pueden incluir análogos lipófilos o profármacos de 2-desoxi-D-glucosa. Los análogos lipófilos incluyen derivados de grupos hidroxilo como ésteres, éteres, fosfoésteres. Otros incluyen la eliminación del grupo hidroxilo y el reemplazo con halógenos como flúor o yodo, o con grupos tiol o tioalquilo. Se puede proporcionar 2-desoxi-glucosa formulada en liposomas y sus análogos o derivados de 2-desoxiglucosa escindibles enzimáticamente. Los ejemplos incluyen glucorónidos con glucósidos en la posición C-1. Los análogos lipofílicos de 2-desoxi-D-glucosa, que pueden actuar como profármacos de 2-desoxi-D-glucosa, tales como mono y diésteres de 2-desoxi-D-glucosa, pueden incluir ejemplos tales como valerato, miristato y palmitato.
- 40

5 Los inhibidores glucolíticos también pueden incluir 6-desoxi-D-glucosa, 6-fluoro-D-glucosa, 6-O-metil-D-glucosa, 6-tio-D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa en sí y sus análogos, 2-desoxi-2-halo-D-glucosa, por ejemplo 2-bromo-, 2-fluoro o 2-yodo-D-glucosa, 3-desoxi o 3-fluoro-D-glucosa o 4-desoxi o 4-fluoro-D-glucosa, 2-fluoro o 3-fluoro-gliceraldehídos o gliceratos, por ejemplo, 3-fluoro-2-fosfoglicerato, ácido 2-fluoro-propiónico o sus sales, ácido 2,2-difluoro-propiónico, 3-halo-piruvato, ácido 3-halopropiónico, ácido 2,2-tiometilacético, 1-desoxi-D-glucosa, 5-tio-D-glucosa, 3-fluoro-D-glucosa y 4-fluoro-D-glucosa, 2-fluoro-, 2-yodo-, 2-tio o 2-metoxi-gliceraldehídos o gliceratos, 3-fluoro-, 3,3-difluoro-, enolasa 3-yodo-, 3-carboxilo y 3-tiogliceratos.

En una realización, la expresión "agente de reducción de la glucólisis citoplásmica" significa un compuesto de Fórmula IV:



Fórmula IV

o una de sus sales, profármacos o ésteres farmacéuticamente aceptables, en donde:

X se selecciona de O y S;

R<sub>1</sub> se selecciona de H, halógeno, OH, -OC(O)R<sub>6</sub>;

15 R<sub>2</sub> a R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente de H, halógeno, OH, -OC(O)R<sub>6</sub>;

R<sub>5</sub> se selecciona de halógeno, OH, SH, -OC(O)R<sub>6</sub>; y

R<sub>6</sub> es alquilo C<sub>1-20</sub>.

20 Halógeno significa preferiblemente F, Br o I, más preferiblemente F. Cada una de las siguientes realizaciones pueden tomarse individualmente o en cualquiera de sus combinaciones. X es O. R<sub>1</sub> es OH. R<sub>2</sub> es H o F. R<sub>3</sub> es OH o F. R<sub>4</sub> es OH o F. R<sub>5</sub> es OH, F o SH.

En otra realización, X es O, R<sub>1</sub> se selecciona de OH, R<sub>2</sub> se selecciona de H, Br, F, I, OH, -C(O)-OR<sub>6</sub>, en donde R<sub>6</sub> se selecciona de alquilo C<sub>1-20</sub>, y de R<sub>3</sub> a R<sub>5</sub> es OH. Preferiblemente, R<sub>2</sub> es H.

#### Agentes activos adicionales

25 Las composiciones farmacéuticas de la primera descripción, segunda descripción y duodécima descripción de la invención pueden comprender además otros agentes activos. La adición de estos agentes activos puede mejorar el tratamiento del cáncer. Usando este enfoque, uno puede ser capaz de lograr una eficacia terapéutica con dosis más bajas de cada agente, reduciendo así la posibilidad de efectos secundarios adversos. También se pueden reducir los efectos secundarios no deseados y permitir el uso de dosis más altas de cada agente. Los agentes activos adicionales pueden proporcionar funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas.

30 Las composiciones farmacéuticas de la primera descripción, segunda descripción y duodécima descripción y la invención pueden, por lo tanto, contener uno o más de los siguientes agentes activos adicionales que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas:

35 Antioxidantes que incluyen vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles, tocotrienoles), antioxidantes polifenólicos (resveratrol, flavonoides), carotenoides (licopeno, carotenos, luteína). El resveratrol ha demostrado tener capacidad antitumoral y quimiopreventiva, en particular el trans-resveratrol para el tratamiento de células humanas de cáncer de mama.

La L-treanina, a saber, la gamma-glutametililamida o 5-N-etil-glutamina, que es un análogo del ácido glutámico o derivado de aminoácido.

Curcuminoides, curcumina o sus derivados.

40 Beta glucanos (1-3, 1-6 beta-glucanos).

Cianuro de hidrógeno (HCN), por ej. los iones OSCN<sup>-</sup> generados por LPO pueden acelerar la proteólisis. Extractos de fitonutrientes que incluyen flavanoles, xantofilas, liminoides.

Inhibidores de la enzima proteasa, p. ej., la aprotinina también conocida como inhibidor de la tripsina pancreática bovina. El uso de inhibidores enzimáticos en combinación con las composiciones farmacéuticas puede facilitar la inhibición de cualquier enzima proteasa que pueda estar presente en el sistema/cuerpo lejos de la célula tumoral y reducir así cualquier efecto indeseable de dichas enzimas activas.

5 Factores de crecimiento (por ejemplo, BMPs, TGF-P, FGF, IGF).

Citocinas (por ejemplo, interleuquinas y CDF).

Antibióticos

Factor de necrosis tumoral (TNF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento fibroblástico ácido o básico (FGF) o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de  
10 inhibir o neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, proteína C, o proteína S, un anticuerpo capaz de unirse al receptor HER2.

Cualquier otro agente activo beneficioso para tratar el cáncer.

15 Cuando se usan otros agentes terapéuticos adicionales en combinación con la proenzima proteasa o el agente activo de las descripciones primera y segunda, se pueden usar en cantidades como se indica en la Physician Desk Reference (PDR) o según lo determinen los expertos en la técnica.

Definiciones

"Activación", en relación con las proenzimas proteasas, significa la conversión in situ (por ejemplo, in vitro o in vivo) de la proenzima proteasa en una forma capaz de mejorar la adhesión célula a célula de las células tumorales, efectuar la proteólisis de las células tumorales o inducir la apoptosis celular en tumores, diferenciación o  
20 inmunoreconocimiento.

La "apoptosis" es un proceso generalmente controlado, ordenado y cuidadoso de autodestrucción celular que puede ser desencadenado por diversos estímulos. La apoptosis es menos invasiva que la necrosis, que puede dañar el tejido circundante y causar inflamación.

25 La "angiogénesis" se refiere a la formación de vasos sanguíneos, en particular la proliferación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes. La angiogénesis es necesaria para que las células cancerosas se conviertan en tumores porque las células cancerosas necesitan un suministro de sangre significativamente mayor que las células normales para sobrevivir. La angiogénesis o los eventos angiogénicos están involucrados en una serie de procesos patológicos, en particular el crecimiento tumoral y la metástasis, y otras afecciones en las que se incrementa la proliferación de los vasos sanguíneos, especialmente del sistema microvascular, como la retinopatía  
30 diabética, la psoriasis y las artropatías.

El término "pericelular" significa en los tejidos que rodean una célula, cerca, sobre o dentro de estos. Más particularmente, el término significa en los tejidos que rodean una célula tumoral o dentro de estos.

El término "intracelular" significa dentro de la célula.

35 Los términos "diferenciación" y "diferenciar", o variaciones similares de los mismos, significan la capacidad de las células para volverse más especializadas para diferentes funciones. En un nivel, se considera que las células tumorales malignas son células que se han desdiferenciado, lo que significa que eran células más especializadas que se han vuelto menos especializadas y, en el proceso, la capacidad del cuerpo para limitar el crecimiento de estas células malignas se ha visto comprometida. Por lo tanto, la diferenciación de las células tumorales implica una transformación de las células malignas, al menos en parte, hacia un tipo de células sanas o normales; lo que  
40 significa una transformación de la célula maligna de manera que reduce las propiedades del crecimiento descontrolado, la invasión y/o la metástasis.

45 El término "inmunoreconocimiento" significa reconocimiento por parte del sistema inmunológico y su posterior retirada o eliminación por parte del sistema inmunitario. Una de las funciones del sistema inmunológico es identificar y eliminar tumores. Las células transformadas de los tumores expresan antígenos que no se encuentran en las células normales. Para el sistema inmunológico, estos antígenos parecen extraños y su presencia hace que las células inmunitarias ataquen las células tumorales transformadas. Algunas formas de células cancerosas también tienen la capacidad de prevenir o reducir el inmunoreconocimiento.

50 El término "metástasis" o "metastatizar" variaciones similares de los mismos se refieren a la propagación de una enfermedad desde un órgano o parte del cuerpo a otro órgano no adyacente o parte del cuerpo. Las células tumorales malignas y las infecciones tienen la capacidad de metastatizar. Por ejemplo, las células cancerosas pueden desprenderse o escapar de un tumor primario, entrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo y volverse a depositar en otras partes del cuerpo. Un nuevo tumor formado a partir de un tumor primario después de la metástasis se denomina tumor secundario o metastático y está compuesto por las mismas células que el tumor primario u original. Por ejemplo, la metástasis del cáncer de mama a los pulmones

forma un tumor secundario que comprende células mamarias anormales, no células pulmonares anormales, y se denomina cáncer de mama metastásico, no cáncer de pulmón.

5 El término "malignidad", "maligno" o variaciones similares de los mismos se refiere a la tendencia de las células cancerosas y los tumores a continuar creciendo y desarrollándose, lo que implica propiedades características de la anaplasia, invasividad y metástasis. Por ejemplo, un tumor maligno puede contrastarse con un tumor benigno no canceroso en el sentido de que un tumor maligno no es autolimitado en su crecimiento, es capaz de invadir tejidos adyacentes y puede propagarse a tejidos distantes (metástasis), mientras que un tumor benigno no tiene ninguna de esas propiedades.

10 "Anaplasia" se refiere a una inversión de la diferenciación en las células, que es característica de los tumores malignos. Este término cubre una mayor capacidad de multiplicación. La anaplasia implica falta de diferenciación, mayor desdiferenciación o mayor pérdida de diferenciación estructural y funcional presente en células normales.

La "proteólisis" es la degradación dirigida (digestión) de las proteínas por parte de las enzimas celulares llamadas proteasas o por la digestión intramolecular. Más particularmente, la proteólisis es la descomposición de las proteínas por las enzimas proteasas que escinden, por hidrólisis, el enlace amida/péptido en las proteínas.

15 Las expresiones "adhesión célula a célula", "moléculas de adhesión celular" o expresiones similares de las mismas se refieren a un intervalo de moléculas de adhesión célula a célula conocidas que generalmente están ubicadas en la superficie exterior de una célula y que están involucradas en la unión de una célula con otra célula o células, siendo la E-cadherina y la  $\beta$ -catenina sus ejemplos. Diferentes tipos de células pueden tener formas alternativas de estas moléculas. Estas moléculas pueden además estar involucradas en la adhesión con la matriz extracelular.  
20 Otras moléculas de adhesión célula a célula pueden seleccionarse entre las familias de proteínas de adhesión celular de cadherina, integrina, selectina e inmunoglobulina.

Los términos "homólogo" y "equivalente funcional" se tomarán para incluir otras proteínas o variantes, como las moléculas conocidas dentro de la misma familia de proteínas, además de las moléculas recombinantes.

25 Por "regulación al alza" se entenderá que esto incluye aumentar el nivel de expresión o actividad de la molécula en relación con un nivel de referencia predeterminado. Esto puede ser un aumento de al menos 5% sobre el nivel de referencia. Particularmente preferida, sin embargo, sería una regulación al alza de al menos 10%, 20% 30%, 40% o 50% o más, en relación con el nivel de referencia. El nivel de referencia se puede determinar por una variedad de medios, como, por ejemplo, de acuerdo con la expresión o actividad de la molécula antes del tratamiento, o de acuerdo con el nivel normal o esperado para un tipo de célula dado.

30 Métodos y usos

El uso de la quinta a la novena descripción o de la decimotercera descripción, o del método de la décima descripción o de la decimocuarta descripción, puede implicar uno o más de los siguientes efectos: reducción en la recurrencia de tumores malignos, reducción en la metástasis de tumores malignos, reducción en el número o tamaño de los tumores, diferenciación de las células tumorales, expresión de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en tumores malignos para  
35 facilitar la adhesión de célula a célula y la reducción de la metástasis, reducción de la capacidad de las células tumorales para prevenir el inmunoreconocimiento.

Una realización de las descripciones proporciona un método para diferenciar una célula cancerosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proenzima proteasa y un agente activo de las descripciones primera y segunda durante un tiempo y en condiciones suficientes para inducir la  
40 diferenciación en la célula cancerosa. El uso de la quinta y sexta descripción y el método de la séptima descripción pueden implicar la diferenciación de una célula cancerosa. En una realización particular, la diferenciación de las células cancerosas es la diferenciación de las células de carcinoma de colon.

En una realización, el uso de la quinta a la novena descripción o de la decimotercera descripción, o el método de la décima descripción o de la decimocuarta descripción, es beneficioso cuando se usa para el tratamiento del cáncer metastásico. La metástasis es la etapa del cáncer donde la enfermedad se propaga a otras partes del cuerpo. Por lo tanto, la prevención o el retraso de la metástasis es particularmente importante, ya que esta etapa se acompaña de una reducción marcada en el éxito de otros tratamientos y una reducción en la supervivencia del sujeto. En otra realización, se proporciona un medio seguro y eficaz para prevenir, retrasar o mejorar de otro modo la metástasis del  
45 cáncer mediante la regulación al alza de las moléculas de adhesión célula-célula en una célula cancerosa a través de la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una proenzima proteasa y un agente activo de las descripciones primera y segunda.  
50

"Tratar" o "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir, mejorar, reducir o ralentizar (disminuir) el cáncer o la diseminación (metástasis) del mismo.

55 "Prevenir", "prevención", "preventivo" o "profiláctico" se refiere a evitar que ocurra, o impedir, salvaguardar o protegerse de la aparición de una condición, enfermedad, trastorno o fenotipo, incluida una anomalía o síntoma. Un

sujeto que necesita prevención puede ser propenso a desarrollar la enfermedad.

El término "mejorar" o "mejora" se refiere a una disminución, reducción o eliminación de una afección, enfermedad, trastorno o fenotipo, incluida una anomalía o síntoma. Un sujeto que necesita tratamiento puede tener previamente la condición, o puede ser propenso a tener la condición o puede ser uno en quien se debe prevenir la condición.

5 El "sujeto" incluye un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, o puede ser un animal doméstico, un animal de zoológico o un animal de compañía. Si bien se contempla particularmente que las composiciones de la invención para su uso en los métodos para el tratamiento médico de seres humanos también son aplicables al tratamiento veterinario, incluido el tratamiento de animales de compañía como perros y gatos, y animales domésticos como caballos, vacas y ovejas, o animales de zoológico tales como felinos, cánidos, bóvidos y ungulados. Un sujeto puede padecer cáncer u otro trastorno, o puede no padecer un cáncer u otro trastorno (es decir, estar libre de una enfermedad detectable).

10 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de composición, o agente o compuesto en la composición, capaz de tratar, prevenir o mejorar el cáncer o la diseminación (metástasis) del mismo. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria en relación con el tratamiento del cáncer, y dará como resultado una mayor esperanza de vida.

15 El uso de la quinta a la novena descripción o de la decimotercera descripción, o sus usos en un método de la décima descripción o de la decimocuarta descripción, puede implicar el tratamiento de neoplasias y afecciones relacionadas, cánceres, tumores, afecciones malignas y metastásicas. Los tejidos y órganos asociados con los tumores sólidos y la metástasis que pueden tratarse con una proenzima proteasa y un agente activo de la primera y segunda descripción incluyen, entre otros, tracto biliar, vejiga, sangre, cerebro, mama, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, cabeza, cuello, riñón, laringe, hígado, pulmón, médula, melanina, ovario, páncreas, próstata, recto, riñón, retina, piel, estómago, testículos, tiroides, tracto urinario y útero.

20 El uso de las descripciones quinta a novena o la descripción decimotercera, o sus usos en un método de la décima descripción o decimocuarta descripción, es particularmente adecuado para tratar los cánceres y los carcinomas metastásicos de los siguientes tipos: cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de intestino, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de mama, melanoma maligno o cáncer de pulmón.

25 El uso de la quinta a la novena descripción o de la decimotercera descripción, o su uso en un método de la décima descripción o de la decimocuarta descripción, puede proporcionar un enfoque de efectos múltiples para tratar el cáncer, por ejemplo, aumentando la apoptosis de las células tumorales, la adhesión célula a célula, la diferenciación y la inmunogenicidad (reconocimiento y eliminación por el sistema inmune). Por lo tanto, es beneficioso realizar un tratamiento en ausencia de cualquier otro tratamiento que pueda suprimir o dañar el sistema inmunológico.

30 En una realización, el uso de las descripciones quinta a novena o la descripción decimotercera, o su uso en un método de la décima descripción o decimocuarta descripción, implica el tratamiento de sujetos que tienen niveles bajos de expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina. También se pueden identificar otros grupos de pacientes que son particularmente adecuados para el tratamiento de acuerdo con el método o el uso de los aspectos anteriores.

35 El uso de la quinta a la novena descripción o de la decimotercera descripción, o su uso en un método de la décima descripción o de la decimocuarta descripción, puede complementarse con otros enfoques terapéuticos anticancerígenos convencionales dirigidos al tratamiento o la prevención de trastornos proliferativos (por ejemplo, tumor). Por ejemplo, tales métodos pueden usarse en la prevención del cáncer profiláctico, la prevención de la recurrencia del cáncer y las metástasis después de la cirugía, y como adyuvante de otras terapias convencionales para el cáncer.

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración.

40 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, pueden formularse, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado para el modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, aromatizantes, etc.) de acuerdo con técnicas tales como las bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica.

45 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima y la invención, pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; sublingualmente, bucalmente, parenteralmente, tal como mediante inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intracisternal (por ejemplo, como soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas inyectables estériles); por vía nasal, tal como por pulverización por inhalación; tópicamente, tal como en forma de una crema o ungüento; o por vía rectal, tal como en forma de supositorios; en formulaciones de dosis unitarias que contienen vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y no tóxicos. Pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o prolongada, por ejemplo, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos, esferoides encapsulados o bombas osmóticas.

Además de los primates, como, p. ej., seres humanos, se puede tratar una variedad de otros mamíferos de acuerdo con los métodos de la décima descripción. Por ejemplo, se pueden tratar mamíferos que incluyen, entre otros, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedoras o murinas.

- 5 El término "composición", como se usa en este documento, pretende abarcar un producto que comprenda la proenzima proteasa y uno o más agentes activos y, opcionalmente, uno o más agentes activos adicionales, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de los mismos.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, significa que el vehículo, diluyente o excipiente no es perjudicial para el receptor de este.

- 10 Los términos "administración de" y "administrar" deben entenderse en el sentido de proporcionar a una persona que necesita tratamiento.

- 15 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o la invención, y las preparaciones o formulaciones de estos se pueden preparar mezclando los componentes de la composición; a saber, las proenzimas de proteasa con uno o más agentes activos, que incluyen un compuesto de selenio y/o un compuesto vaniloide. En una realización adicional de las descripciones, los componentes pueden incluir un agente activo adicional como se describe en el presente documento. La mezcla se puede realizar secuencial o simultáneamente.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de poner juntos los agentes activos y la proenzima proteasa con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan poniendo juntos de manera uniforme e íntima los agentes activos y las proenzimas de proteasa con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada. Los agentes activos y las proenzimas de proteasa de las descripciones se proporcionan en una forma de unidad de dosis en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o el estado de las enfermedades después de la administración única o repetida.

- 30 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, tabletas, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y sabrosas. Los comprimidos contienen la proenzima proteasa y el agente activo de la primera y segunda descripción en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para el control de la liberación.

- 45 Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que la proenzima proteasa y el agente activo de las descripciones primera y segunda se mezclan con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde la proenzima proteasa y el agente activo de las descripciones primera y segunda se mezclan con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

- 50 Las suspensiones acuosas de las descripciones contienen el agente activo y la proenzima proteasa en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Los excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, la carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenooxicetanol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, como el monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más

conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

5 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el agente activo y la proenzima proteasa en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como la parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Agentes edulcorantes tales como los expuestos anteriormente, y agentes saborizantes pueden agregarse para proporcionar una preparación oral sabrosa. Estos pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

10 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan la proenzima proteasa y el agente activo de la primera y segunda descripción en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión se ejemplifican por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

15 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo, goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilén sorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. También pueden contener agentes demulcentes, conservantes, aromatizantes y colorantes.

25 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. Las composiciones farmacéuticas de la primera y segunda descripción también pueden ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butano-diol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

35 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, se formulan como supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas formulaciones se pueden preparar mezclando la proenzima proteasa y el agente activo de las descripciones primera y segunda con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas ordinarias, pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles. La administración rectal se puede usar para eliminar el efecto de primer paso entero-hepático en el tracto gastrointestinal relacionado con la administración oral de enzimas.

45 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, también pueden formularse en liposomas. Como se sabe en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. La formulación de liposomas puede contener estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y fosfatidilcolinas, tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica.

50 Las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración. Las proenzimas de proteasa y los agentes activos y, opcionalmente, el agente activo adicional, de la composición farmacéutica se pueden proporcionar como componentes separados en el contenedor, paquete o dispensador, para ser tomados por separado o juntos en el mismo momento, o diferente, en el uso de la quinta a la novena descripción o su uso en un método de la décima descripción.

55 Dosis y cantidades terapéuticamente eficaces

Un nivel de dosificación apropiado para las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda, o la descripción duodécima o de la invención, será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal por día por paciente, que puede administrarse en dosis únicas o múltiples. Puede ser de aproximadamente

0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, de aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día, o de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este intervalo, la dosis puede ser de 0,05-0,5, 0,5-5 ó 5-50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas de las descripciones primera y segunda pueden proporcionarse en forma de comprimidos que contienen 1,0-4000 miligramos de la proenzima proteasa y el agente activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 750,0, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, y 4000 miligramos de la proenzima proteasa y el agente activo para el ajuste sintomático de la dosis al paciente a tratar. Las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces por día, una o dos veces por día, o una vez al día, con requisitos reducidos de administración que generalmente conducen a un mayor cumplimiento.

La dosis puede variar ampliamente dependiendo de si se administra una única forma de administración de la composición y si el compuesto vaniloide se incluye como agente activo en la composición o tableta (u otra forma de administración). Típicamente, los compuestos vaniloides tales como un capsiato o una capsaicina pueden proporcionarse en dosis relativamente grandes de entre 0,1 a 5 g y, más particularmente, de aproximadamente 1-2 g por administración.

Una administración única adecuada para una realización de las composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento puede comprender:

- Tripsinógeno en una cantidad de entre 1-100 mg, particularmente 2-50 mg, más particularmente (en mg) 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0;
- Quimotripsinógeno en una cantidad de entre 1-100 mg, particularmente 2-50 mg, más particularmente (en mg) 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0;
- Compuesto de selenio en una cantidad de entre 0,01-3 mg, particularmente 0,1-1 mg, más particularmente (en mg) 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0;
- Compuesto vaniloide en una cantidad de entre 0,1-4000 mg, particularmente 0,5-3000 mg, más particularmente (en mg) 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000;
- Amilasa en una cantidad de entre 0,1 y 100 mg, particularmente 1-15 mg, más particularmente 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0;
- 2-Desoxi-D-glucosa en una cantidad de entre 0,1-100 mg, particularmente 1-15 mg, más particularmente 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0.

Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el momento de la administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la gravedad de la afección en particular y el huésped que recibe la terapia.

Los niveles de dosificación adecuados para los diversos componentes (si están presentes) de una realización de las composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento, pueden comprender:

- Quimotripsinógeno en una cantidad de al menos 0,2 mg/kg, o en un intervalo de 0,2-5 mg/kg, en un intervalo de 0,5 a 2,0 mg/kg, o aproximadamente 0,8 mg/kg;
- Tripsinógeno en una cantidad inferior a 0,5 mg/kg, o en un intervalo de 0,01 a 0,4 mg/kg, o en un intervalo de 0,05 a 20 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg;
- Metilselenocisteína en una cantidad de al menos 0,0001 mg/kg, o en un intervalo de 0,001-0,01 mg/kg, en un intervalo de 0,002-0,005 mg/kg, o aproximadamente 0,003 mg/kg;
- Capsiato en una cantidad de al menos 1 mg/kg, o en un intervalo de 5-500 mg/kg, o en un intervalo de 10-100 mg/kg, o aproximadamente 30 mg/kg;
- Amilasa en una cantidad de al menos 0,001 mg/kg, o en un intervalo de 0,01-0,1 mg/kg, en un intervalo de 0,02-0,05 mg/kg, o aproximadamente 0,03 mg/kg;
- 2-Desoxi-D-glucosa en una cantidad de al menos 1 mg/kg, o en un intervalo de 5-500 mg/kg, o en un intervalo de 10-100 mg/kg, o aproximadamente 30 mg/kg.

Una relación adecuada en % en peso para los diversos componentes (si están presentes) de una realización de las composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento, puede comprender:

quimotripsinógeno:tripsinógeno:amilasa:2-desoxiglucosa:capciato:metilselenocisteína en una proporción de 200-400:25-75:5-15:5.000-20.000:5.000-20.000:0,1-10, o aproximadamente 300:50:10:10.000:10.000:1.

Las concentraciones adecuadas para los diversos componentes (si están presentes) de las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento, que pueden ser particularmente efectivas si están presentes en la superficie de una célula tumoral, o cerca de ésta, pueden comprender:

- 5 • Quimotripsinógeno en una concentración de al menos 0,5 mg/ml, o en un intervalo de 1-2 mg/ml;
- Tripsinógeno en una concentración inferior a 0,25 mg/ml, o en un intervalo de 0,1 a 0,2 mg/ml;
- Amilasa en una concentración de al menos 0,01 mg/ml, o en un intervalo de 0,02-0,1 mg/ml;
- Compuesto vaniloide en una concentración de al menos 5 mg/ml, o en un intervalo de 10-20 mg/ml;
- 10 • 2-Desoxi-D-glucosa en una concentración de al menos 5 mg/ml, o en un intervalo de 10-20 mg/ml;
- Compuesto de selenio en una concentración de menos de 0,01 mg/ml, o en un intervalo de 0,001-0,005 mg/ml.

15 Puede proporcionarse una mejor actividad más para las composiciones farmacéuticas si la concentración, o cantidad relativa, del compuesto de selenio se mantiene dentro de un intervalo específico cuando está presente. La concentración de metilselenocisteína puede ser inferior a 0,01 mg/ml, inferior a 0,005 mg/ml, inferior a 0,001 mg/ml, inferior a 0,0005 mg/ml o en el intervalo de 0,0005 a 0,01 mg/ml, o el intervalo de 0,001 a 0,005 mg/ml.

#### Formulación de Proenzima Quimotripsinógeno/Tripsinógeno

20 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una primera y una segunda proenzima proteasa capaz de activarse en la superficie, o cerca de ésta, de una célula tumoral para mejorar la adhesión célula a célula de las células tumorales, efectuar la proteólisis de las células tumorales o inducir la apoptosis de las células tumorales, diferenciación o inmunoreconocimiento, en el que la primera proenzima proteasa es quimotripsinógeno y la segunda proenzima proteasa es tripsinógeno, y la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está en el intervalo de 4:1 a 8:1. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes activos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

25 En una realización, la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está en el intervalo de entre 5:1 a 7:1, preferiblemente de 6:1.

#### Formulación del agente activo

30 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende un primer y segundo agente activo, cada uno capaz de inducir actividad intracelular en células tumorales, en el que el primer agente activo es un compuesto de selenio y el segundo agente activo es un agente de reducción de la glucólisis citoplásmica.

En una realización, la actividad intracelular es la apoptosis de células tumorales, inmunoreconocimiento o diferenciación. El compuesto de selenio y/o el agente de reducción de la glucólisis citoplásmica comportan un compuesto como se describe en las realizaciones anteriores. Preferiblemente, el compuesto de selenio es metilselenocisteína. Preferiblemente, el agente de reducción de la glucólisis citoplásmica es 2-desoxi-D-glucosa.

35 La composición farmacéutica puede comprender además una proenzima proteasa de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender además un agente activo seleccionado de un compuesto vaniloide y una glicosida hidrolasa de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

#### Métodos de detección e identificación

40 Una realización adicional proporciona un método para identificar un agente útil en la regulación al alza de la expresión de moléculas de adhesión célula-célula de una o varias células cancerosas, comprendiendo el método poner en contacto una célula cancerosa o moléculas de adhesión célula-célula de la célula cancerosa con una composición como se describió anteriormente en este documento, que agrega un agente de prueba, monitorea o mide el nivel de adhesión célula-célula o de expresión de moléculas de adhesión célula-célula y evalúa el efecto del agente de prueba. La selección de bibliotecas químicas de compuestos pequeños y la detección de expresión de anticuerpos son ejemplos de fuentes disponibles de agentes de prueba que pueden evaluarse fácilmente utilizando este tipo de procedimientos. Por ejemplo, el cribado químico de alto rendimiento (HTS) se puede utilizar fácilmente para cribar miles de moléculas, como agentes químicos o anticuerpos, mediante robótica y placas de microtitulación. Para desarrollar una detección de este tipo, es necesario proporcionar un ensayo de detección adecuado que se realice durante la detección. Este ensayo de detección incorporaría una molécula de adhesión célula-célula o una célula cancerosa como una célula cancerosa metastásica. El ensayo incluiría células de referencia y, opcionalmente, ofrecería la comparación de la adición de compuestos de prueba, proenzimas y enzimas opcionales. De manera

50

similar, las técnicas de expresión de fagos pueden utilizarse fácilmente para proporcionar un método de alto rendimiento para la evaluación de agentes potenciales útiles en la regulación al alza de la expresión de moléculas de adhesión célula-célula de células cancerosas.

Puntos generales

5 Cualquier discusión de documentos, actuación, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte de la base del estado de la técnica o eran de conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención, tal como existía en Australia antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

10 Las presentes realizaciones deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas y no restrictivas.

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva, las formas singulares "un" "uno/una" y "el/la" incluyen a las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un disolvente" incluye mezclas de disolventes, la referencia a "un agente" incluye mezclas de dos o más de dichos agentes, y similares.

15 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción anterior de la invención, excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido al lenguaje expreso o la implicación necesaria, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se usan en un sentido inclusivo; es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero no para excluir la presencia o adición de características adicionales en las diversas realizaciones de la invención.

20 Materiales y métodos

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más claramente, los detalles técnicos se describirán a continuación con referencia a los siguientes experimentos y ejemplos.

Experimento 1: Identificación del mecanismo de acción de las proenzimas.

25 Se realizó una investigación de los efectos y mecanismos involucrados en el tratamiento de líneas celulares de cáncer con composiciones farmacéuticas que comprendían tripsinógeno y quimotripsinógeno en tres tipos diferentes de líneas celulares. Las líneas celulares utilizadas fueron Panc1: una línea celular de carcinoma ductal pancreático humano, Caco2: una línea celular de adenocarcinoma de colon humano, y OE33: una línea celular de adenocarcinoma esofágico.

30 Todas las líneas celulares se mantuvieron en matraces de cultivo T 75 a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios utilizados para mantener las células en cultivo fueron: medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) para PANC1; Medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) para CaCO<sub>2</sub> y medio RPMI 1640 para OE33 (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). Todos los medios se complementaron con suero bovino fetal al 10% (FBS; Invitrogen), 100 UI/ml de penicilina (Invitrogen), 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Sigma).

35 El tripsinógeno (Try) y el α-quimotripsinógeno (Chy) se pueden comprar en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se pueden obtener de origen pancreático bovino. Las formulaciones se proporcionaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma) y se diluyeron cuando fue necesario con suero bovino fetal al 10%.

Se prepararon y probaron una serie de formulaciones, y se codificaron de acuerdo con la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Códigos de Formulación

Código de Formulación	Combinación
B:	Quimotripsinógeno; Tripsinógeno y Elastasa
C:	Placebo
J:	Quimotripsinógeno; Tripsinógeno y α-Amilasa
T:	Quimotripsinógeno y Tripsinógeno

40 Se prepararon varias concentraciones para obtener una comprensión de la concentración de la formulación que efectúa la viabilidad celular. Sobre la base de una concentración inicial original de cada mezcla designada como 1 ×, se codificaron y conformaron seis diluciones diferentes de cada una de las formulaciones, como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Concentraciones de enzimas

Dilución	Concentraciones de enzimas
0,25x	Tripsinógeno: 0,00325 mg/ml
	$\alpha$ -Quimotripsinógeno: 0,00325 mg/ml
	$\alpha$ -Amilasa: 0,00075 mg/ml
	Elastasa: 0,0005 mg/ml
0,5x	Tripsinógeno: 0,0065 mg/ml
	$\alpha$ -Quimotripsinógeno: 0,0065 mg/ml
	$\alpha$ -Amilasa: 0,015 mg/ml
	Elastasa: 0,001 mg/ml
1x	Tripsinógeno: 0,013 mg/ml
	$\alpha$ -Quimotripsinógeno: 0,013 mg/ml
	$\alpha$ -Amilasa: 0,003 mg/ml
	Elastasa: 0,002 mg/ml
1,25x	Tripsinógeno: 0,0162 mg/ml
	$\alpha$ -Quimotripsinógeno: 0,0162 mg/ml
	$\alpha$ -Amilasa: 0,00375 mg/ml
	Elastasa: 0,0025 mg/ml
2,5x	Tripsinógeno: 0,0325 mg/ml
	$\alpha$ -Quimotripsinógeno: 0,0325 mg/ml
	$\alpha$ -Amilasa: 0,0075 mg/ml
	Elastasa: 0,005 mg/ml
5x	Tripsinógeno: 0,065 mg/ml
	$\alpha$ -Quimotripsinógeno: 0,065 mg/ml
	$\alpha$ -Amilasa: 0,015 mg/ml
	Elastasa: 0,01 mg/ml

5 Para obtener una correlación entre la densidad óptica y el número de células, se sembró un número de células conocido y, después de unir las células, las células se tiñeron con sulforodamina B (SRB). Este método proporcionó datos de absorbancia o densidad óptica de las células después de la tinción y permitió el desarrollo de curvas estándar para convertir la absorbancia en el número de células para cada tipo de célula como se muestra en la FIG. 1.

Efecto de las formulaciones en líneas celulares de prueba

10 Para determinar el efecto citotóxico de las formulaciones sobre las líneas celulares de prueba, las células se colocaron en placas y se trataron con las formulaciones. El efecto se evaluó mediante ensayo de proteínas y microscopía.

15 Se usó la tinción de la proteína SRB para probar el efecto de diferentes formulaciones sobre la proliferación celular. El tinte se une a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares y, a través de la evaluación colorimétrica, proporciona una estimación de la masa proteica total, que está relacionada con el número de células. Los valores de la concentración inhibitoria máxima media ( $CI_{50}$ ) se determinaron a partir de curvas de log-lineal dosis-respuesta

para cada formulación.

5 Día 1: Se sembraron células en placas de cultivo de 24 pocillos a baja densidad (1000-3000 células por pocillo, dependiendo del tipo de célula). Las líneas celulares utilizadas fueron Panc1: línea celular de carcinoma ductal pancreático humano, Caco2: línea celular de cáncer colorrectal, OE33: línea celular de cáncer de esófago y HEK293. HEK293 es una línea celular transformada derivada de riñón embrionario humano. Se usó una placa de cultivo de 24 pocillos de cada línea celular para probar cada una de las diferentes formulaciones de combinación. Cada una de las diluciones de la formulación se probó en cuatro pocillos. Se usó una placa de cultivo de 24 pocillos de cada línea celular como control, se sembró el mismo número de células y se cambió el medio cuando las células se trataron.

10 Día 2: Se retiró el medio y se añadió a las células medio recién preparado que contenía las diferentes diluciones de las formulaciones.

Día 5: Se eliminó de nuevo el medio y se añadió a las células medio recién preparado que contenía las diferentes diluciones de las formulaciones.

15 Día 6 ó 7: Las células se fijaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA) frío (4°C). Tras una suave aspiración del medio, se añadió TCA a los pocillos. Las placas se dejaron durante 30 min a 4°C, se lavaron 3 veces con agua desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos 24 h.

20 Las células fijas se tiñeron con SRB de la siguiente manera. Se añadió 1 ml de 0,4% de SRB (p/v en solución de ácido acético al 1%) a cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró el SRB y las placas se lavaron 3 veces con ácido acético al 1% antes de secar al aire. La SRB unida se solubilizó con 500 ml de solución de base Tris 10 mM y las placas se dejaron en un agitador de placas durante al menos 10 minutos. Se transfirieron 100 ml de cada pocillo a un pocillo de una placa de 96 pocillos; esto se realizó 3 veces por pocillo de la placa de 24 pocillos. La absorbancia se leyó en un lector de placas de 96 pocillos a 492 nm.

Efecto de las formulaciones sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de esófago (OE33)

25 Las células OE33 se sembraron a una densidad de 3000 células/ml (Día 1). Las células fueron tratadas con 0,25 ×; 0,5 ×; 1 ×; 1,25 ×; 2,5 × y 5 × de las diferentes formulaciones en el Día 2 y el Día 5. Las células se fijaron en el día 7.

Microscópicamente, el tratamiento con la formulación B hizo que las células mostraran una morfología redondeada, lo que también causó la contracción celular y un mayor desprendimiento. Por lo tanto, después de 48 horas de incubación, solo quedaron unidas unas pocas células y los restos celulares y las células flotantes eran visibles en el medio (Figura 2).

30 Los resultados observados por microscopía óptica fueron corroborados por el ensayo de tinción de la proteína SRB. La Tabla 3 muestra el valor medio para 4 pocillos replicados de cada tratamiento, el efecto sobre la muerte celular de la formulación B fue dependiente de la concentración; 2,5 × y 5 × matan todas las células en los pocillos. El valor de CI<sub>50</sub> se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración, como se muestra en la FIG. 3.

35 El control, que se muestra como la DO para la concentración 0, fue la media de 24 pocillos duplicados. En el momento de la fijación, todos los 24 pocillos de la placa de control eran completamente confluentes.

Tabla 3: Efecto de diferentes concentraciones de la formulación B en las células OE33

CONC (1)	OE33 B (1)
0	0,851
0,4	0,819
0,2	0,814
1	0,812
1,25	0,815
2,5	0,076
5	0,076

Efecto de las formulaciones en células de carcinoma de conducto pancreático humano (panc1)

Las células Panc1 se sembraron a una densidad de 20.000 células/ml (día 1). Las células fueron tratadas con 0,25

×; 0,5 ×; 1 ×; 1,25 ×; 2,5 × y 5 × de las diferentes formulaciones el día 2 y el día 4. Las células se fijaron en el día 5. La formulación de control C a las concentraciones probadas no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células Panc1 (datos no mostrados). Microscópicamente, las formulaciones B, J y T mostraron un efecto sobre la viabilidad celular, las células tratadas con 2,5 × y 5 × de estas formulaciones se redondearon y murieron (datos no mostrados).

- 5 Los resultados observados por microscopía óptica fueron corroborados por el ensayo de tinción de la proteína SRB. La Tabla 4 muestra el valor medio para 4 pocillos replicados de cada concentración de las formulaciones utilizadas. El efecto sobre la muerte celular de la formulación B, J y T dependió de la concentración; 2,5 × y 5 × matando a todas las células en los pocillos como se muestra en la FIG. 4. El valor de IC<sub>50</sub> se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración como se muestra en la FIG. 4. El control, que se muestra como la DO para la concentración 0, fue la media de 24 pocillos duplicados.

Tabla 4 Efecto de las formulaciones B, J y T en las células Panc1

CONCENTRACIÓN	B	J	T
	OD	OD	OD
0	0,442	0,442	0,442
0,4	0,447	0,542	0,514
0,2	0,465	0,548	0,529
1	0,440	0,517	0,538
1,25	0,450	0,501	0,599
2,5	0,237	0,284	0,511
5	0,063	0,046	0,076

Efecto de las formulaciones sobre células del cáncer colorrectal (Caco2)

- 15 Se sembraron células Caco2 a una densidad de 20.000 células/ml (día 1). Las células fueron tratadas con 0,25 ×; 0,5 ×; 1 ×; 1,25 ×; 2,5 × y 5 × de las diferentes formulaciones, el día 2 y el día 4. Las células se fijaron en el día 5. La formulación C a las concentraciones probadas no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células Caco2, después del tratamiento en el día 5, las células mostraron una monocapa confluyente y saludable (datos no mostrados).

- 20 El ensayo de tinción de la proteína SRB (Tabla 5) muestra el valor medio de 4 pocillos replicados de cada concentración de las formulaciones utilizadas, el efecto sobre la muerte celular de la formulación B, J y T fue dependiente de la concentración: 2,5 × y 5 × eliminadas todas las células en los pocillos como se muestra en la FIG. 5. La menor concentración de estas tres formulaciones no tuvo efecto en la viabilidad celular, como se puede observar, las densidades ópticas (OD) registradas no fueron significativamente diferentes del grupo de control. El control fue la media de 24 pocillos duplicados, en el momento de la fijación, todos los 24 pocillos de la placa de control eran completamente confluentes.

Tabla 5: Efecto de las formulaciones B, J y T sobre las células Caco2

CONC (1)	B (1)	J (1)	T (1)
0	0,421	0,421	0,421
0,4	0,370	0,387	0,440
0,2	0,393	0,440	0,431
1	0,384	0,429	0,515
1,25	0,395	0,458	0,478
2,5	0,251	0,131	0,304
5	0,078	0,074	0,176

Los tratamientos B, J y T tienen un efecto tóxico en todos los tipos de células probados. La concentración de las formulaciones B, J y T que muestran un efecto sobre la viabilidad celular fue de  $2,5 \times$  y  $5 \times$ . Después del tratamiento, las células muestran una morfología redondeada, encogimiento celular y aumento del desprendimiento.

Determinación de  $IC_{50}$  de las formulaciones

- 5 El valor de  $CI_{50}$  para cada formulación se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración. La  $IC_{50}$  de las diferentes formulaciones se obtuvo para las líneas celulares: Caco2, Panc1 y OE33 cuando se administró dos veces en una semana. Los valores finales de  $CI_{50}$  (con las correspondientes concentraciones reales de mg/ml) se utilizaron en los ensayos celulares posteriores.

Tabla 6A:  $CI_{50}$  de las formulaciones en Panc1

	B (2,4x)	J (2,5x)	T (2,5x)
Tripsinógeno (mg/ml)	0,031	0,0032	0,0032
Quimotripsinógeno (mg/ml)	0,031	0,0032	0,0032
Elastasa(mg/ml)	0,0048	0,0075	-

10

Tabla 6B:  $CI_{50}$  de formulaciones en células OE33

	B (2,4x)	J (2,5x)	T (2,5x)
Tripsinógeno (mg/ml)	0,031	0,0032	0,0032
Quimotripsinógeno (mg/ml)	0,031	0,0032	0,0032
Elastasa (mg/ml)	0,0048	0,0075	-

Tabla 6C:  $CI_{50}$  de formulaciones en células Caco2

	B (2,5x)	J (2,4x)	T (2,5x)
Tripsinógeno (mg/ml)	0,032	0,031	0,032
Quimotripsinógeno (mg/ml)	0,032	0,0031	0,0032
Elastasa (mg/ml)	0,005	0,0072	-

- 15 Expresión de marcadores de adhesión celular

Se investigaron los cambios en la expresión de los marcadores de adhesión celular de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en células Panc1, OE33 y Caco2 después del tratamiento con la concentración de  $CI_{50}$  de las formulaciones J y T.

- 20 Las células se trataron con la concentración de  $CI_{50}$  de las formulaciones. Las células se recogieron, se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos. Las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron posteriormente con acetona/metanol (1:1) enfriado con hielo durante 5 minutos a  $-20^{\circ}C$ . Las células se lavaron tres veces en PBS y se bloquearon en solución de tampón de bloqueo al 2% durante 1 hora temperatura ambiente. Las células se incubaron durante la noche en un anticuerpo primario diluido en una solución tampón de bloqueo a  $4^{\circ}C$ . Las células se lavaron tres veces en PBS y luego se incubaron durante 2 horas con anticuerpos secundarios en una solución tampón de bloqueo. Las células se lavaron tres veces en PBS y se incubaron 15 minutos en 1:1000 DAPI/PBS (para demostrar la tinción nuclear) a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medios de montaje. Los controles se realizaron con células no tratadas.

- 30 La tinción por inmunofluorescencia indirecta se realizó utilizando anticuerpos monoclonales producidos contra E-cadherina (Transduction Labs BD Biosciences Clone 36) y  $\beta$ -catenina (Transduction Labs BD Biosciences Clone 14). El anticuerpo secundario utilizado es la fluoresceína anti-ratón de caballo (Vector Labs FI2000).

El incremento de la expresión de  $\beta$ -catenina y E-cadherina después del tratamiento con las formulaciones probadas se cuantificó midiendo la intensidad de fluorescencia de las muestras bajo microscopía de fluorescencia; se midieron diferentes campos de una misma muestra y la media de las colecciones de intensidad se muestra en Tabla 7.

Tabla 7: Media de la intensidad de fluorescencia de las células tratadas con las formulaciones J y T

	Panc1		Caco2		OE33	
	J	T	J	T	J	T
E-cadherina	21,99	33,59	78,03	73,13	47,27	-
Control	12,92	10,02	10,59	12,43	6,06	-
$\beta$ -catenina	32,92	42,92	64,20	67,05	34,62	-
Control	10,58	9,32	11,92	5,92	16,22	-

Resumen

5 Las células Panc1, Caco2 y OE33, cuando se trataron con la concentración de  $CI_{50}$  de las formulaciones J y T, mostraron un aumento en la intensidad de la inmunofluorescencia cuando se compararon con las células no tratadas. Esto se correlaciona con un aumento en la expresión de  $\beta$ -catenina y E-cadherina en células cancerosas en comparación con las células de control, como se muestra en las Figs. 6 a 13. La  $\beta$ -catenina y la E-cadherina se muestran en verde y los núcleos se muestran en azul.

Ejemplo 1: Formulaciones mejoradas de proenzimas

10 Se realizó un estudio para determinar el efecto de la formulación de proenzima que comprende tripsinógeno (pT), quimotripsinógeno (pC) y  $\alpha$ -amilasa (A) (formulación denominada JBp1) sobre el crecimiento de 24 líneas celulares de cáncer. Sobre la base de los valores de  $CI_{50}$  y de inhibición máxima generados en este estudio inicial, se seleccionaron tres líneas celulares para comprender mejor los efectos de los tres componentes individuales en JBp1 sobre el crecimiento de las células cancerosas. El estudio aplicó el método isobolográfico para comprender la interacción entre los tres componentes de JBp1:  $\alpha$ -amilasa, tripsinógeno y quimotripsinógeno. Sobre la base de los resultados obtenidos, se propuso y probó una formulación mejorada (JBp1vP) en estudios isobolográficos con una segunda formulación que comprendía 2-desoxi-D-glucosa (D), capsaiato (C) y metilselenocisteína (M).

Resumen

20 Las propiedades inhibitorias del crecimiento celular de la formulación de proenzima JBp1 se estudiaron en un panel de 24 líneas celulares de cáncer humano. Se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  para la mayoría de las líneas celulares en este panel. Sobre la base de los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento, se seleccionaron tres líneas celulares, A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2 para estudios de combinación adicionales utilizando el método isobolográfico. El uso de isobogramas permitió el estudio del nivel de interacción entre los tres componentes individuales de JBp1:  $\alpha$ -amilasa, tripsinógeno y quimotripsinógeno. Al estudiar la actividad de la inhibición del crecimiento de los componentes individuales en combinación entre sí y las mezclas de dos componentes, se identificó una composición mejorada de la formulación JBp1 y se denominó "JBp1vP". Esta formulación mejorada se probó en ensayos de combinación contra una segunda formulación que comprendía 2-desoxi-D-glucosa (D), capsaiato (C) y metilselenocisteína (M), en donde la segunda formulación se denomina DCM y la combinación de la primera y segunda formulación que se conoce como JBp1vP-DCM. El análisis isobolográfico de la interacción entre JBp1vP y DCM mostró el potencial para actuar de forma sinérgica, especialmente a bajas concentraciones de DCM (ver resultados para la línea celular MIAPaCa-2 en la Figura 14 y la Tabla 8).

Tabla 8: Resumen del análisis isobolográfico para quimotripsinógeno, tripsinógeno,  $\alpha$ -amilasa y combinaciones duales en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2

A-549								
	T	C	A	TC	TA	CA	JBp1vP	DCM
T		WR	NR			-		
C	WR		N		NR			
A	NR	N		N				
TC			N					
TA		NR						

ES 2 692 377 T3

CA	-							
JBp1vP								N
DCM							N	
HCT-15								
	T	C	A	TC	TA	CA	JBp1vP	DCM
T		N	N			NR		
C	N		N		N			
A	N	N		N				
TC			N					
TA		N						
CA	NR							
JBp1vP								N
DCM							N	
MIAPaCa-2								
	T	C	A	TC	TA	CA	JBp1vP	DCM
T		WR	WR			WR		
C	WR		WR		NR			
A	WR	WR		NR				
TC			NR					
TA		NR						
CA	WR							
JBp1vP								NR
DCM							NR	

Leyenda:

T: tripsinógeno

C: quimotripsinógeno

5 A:  $\alpha$ -amilasa

TC: quimotripsinógeno:tripsinógeno (6:1)

TC: quimotripsinógeno: $\alpha$ -amilasa (1:0,25)

TA: tripsinógeno: $\alpha$ -amilasa (1:0,25)

WR: Interacción sinérgica de amplio rango (valores de más de 7 g por debajo de 1,0)

10 NR: Interacción sinérgica de rango estrecho (valores de 3 a 7 g por debajo de 1,0)

N: Interacción no sinérgica (valores de menos de 3 g por debajo de 1,0)

Método isoblográfico

Las relaciones dosis-respuesta de los agentes pueden usarse para construir un modelo que dé el efecto esperado

de una combinación. La combinación de los fármacos A y B se denominará (da, db) donde da y db son dosis de A y B. El efecto se trata como una función matemática, E (da, db). E, a veces, se expresa como un efecto fraccionario, entonces la fracción de supervivencia es S:S = 1 - E. Finalmente, Da y Db son dosis de los medicamentos A y B administrados por separado, lo que produce una respuesta igualmente eficaz con la combinación. Los isoboles (curvas de efecto iso) se pueden construir basándose en el supuesto de que no haya interacción entre los fármacos utilizados en combinación. La combinación (da, db) está representada por un punto en un gráfico que tiene ejes que representan dosis de los medicamentos individuales. Se espera que, si los medicamentos no interactúan, este punto caerá en una línea recta (isobolo) que conecte los dos ejes entre los valores que representan las dosis (Da y Db) e igualmente eficaces con la combinación (da, db). La ecuación para la interacción cero isobolo para dos compuestos es:

$$\frac{d_a}{D_a} + \frac{d_b}{D_b} = 1 \quad (1)$$

Cuando el número de compuestos en combinación es n, la ecuación es:

$$\sum_{i=1}^n \frac{d_i}{D_i} = 1 \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (2)$$

Cuando los fármacos en la combinación son igualmente eficaces con las dosis individuales, el isobolo es una línea recta. Sin embargo, si el efecto de la combinación es mayor del esperado a partir de las curvas de dosis-respuesta individuales, entonces se necesitan cantidades más pequeñas de da y/o db para producir un efecto equipotente para Da y Db (ambos sin cambios), por lo tanto:

$$\frac{d_a}{D_a} + \frac{d_b}{D_b} < 1 \quad (3)$$

Esta relación también se denomina valor g y se utiliza para determinar el tipo de interacción. En este caso, el isobolo calculado es cóncavo. El antagonismo produciría efectos en la dirección opuesta; por lo tanto, el isobolo que representa este tipo de interacción sería convexo.

En resumen, los valores de g pueden ser:

<1      superadictivo (sinérgico)

$$\frac{d_a}{D_a} + \frac{d_b}{D_b} = 1 \quad \text{adictivo (zona de interacción)}$$

>1      subadictivo (antagónico)

Se estudió la interacción entre los tres componentes de la nueva formulación JBp1 (α-amilasa, tripsinógeno y quimotripsinógeno). Además, se empleó el método isobolográfico para determinar una proporción mejorada de los tres componentes en la formulación. La formulación mejorada de JBp1 se estudió luego en combinación con una segunda formulación DCM.

#### Materiales y métodos

Se obtuvieron placas de cultivo celular estériles de fondo plano de 96 pocillos de Becton-Dickinson (North Ryde, NSW, Australia); medio de cultivo celular RPMI 1640 y DMEM, FBS, GlutaMax, penicilina-estreptomicina, piruvato de sodio, HEPES, HAM, FCS y DPBS se obtuvieron de Invitrogen Australia (Mt Waverley, VIC, Australia); Azul de Tripiano se obtuvo de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia); el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue® se obtuvo de Promega (Madison, WI, EE.UU.); el fluorómetro SpectraMax Gemini XPS se obtuvo de Molecular Devices (Sunnyvale, California, EE.UU.).

Todas las líneas celulares utilizadas en estos estudios fueron de origen humano y se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Md., EE.UU.).

La siguiente Tabla 9 muestra las condiciones de crecimiento y las densidades iniciales de siembra de células en células por pocillo utilizadas en todas las pruebas de CI<sub>50</sub> y ensayos de combinación. Las células se cultivaron a 37°C en una incubadora de cultivo celular humidificada con 95% de aire/5% de CO<sub>2</sub>.

Tabla 9: Condiciones de crecimiento y densidades de siembra para el estudio de  $Cl_{50}$  y ensayos combinados

Línea celular	Tipo de tumor	Medio de cultivo celular	Densidad de siembra
COLO-205	Carcinoma, colorrectal	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	2000
COLO-201	Carcinoma, colorrectal	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	2500
HCT-116	Carcinoma, colorrectal	RPMI + 10 % FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	2000
HCT-15	Carcinoma colorrectal	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	2000
HT-29	Adenocarcinoma, colorrectal	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000
BxPC-3	Adenocarcinoma	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000
MIAPaCa-2	Carcinoma	DMEM + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep + 1% HEPES + 1% NaPy	4000
PANC-1	Carcinoma epitelioides	DMEM + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	3000
A2780	Ovario, adenocarcinoma	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000
OVCAR-3	Ovario, adenocarcinoma	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	3000
SK-OV-3	Adenocarcinoma, ovario, Ascitos Malignos	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000
BT-474	Carcinoma de mama	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	5000
MDA-MB-231	adenocarcinoma de mama	DMEM + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	5000
MDA-MB-453	Carcinoma de mama	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	5000
MDA-MB-468	Adenocarcinoma de mama	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000
A549	NSCLC	RPMI + 10 % FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	3000
HOP-92	NSCLC, derrame pleural	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000
NCI-H460	NSCLC, derrame pleural	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	3000
NCI-H520	NSCLC, carcinoma de células escamosa + RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000	
NCI-H596	NSCLC, carcinoma adenoescamoso	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	3000
NIC-H82	NSCLC	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax +	5000

		1% Pen/Strep	
OE- 21	escamoso esofágico	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	5000
OE-33	escamoso esofágico	RPMI + 10% FCS + 1% GlutaMax + 1% Pen/Strep	5000
KYSE-30	carcinoma de células escamosas	RPMI + F12 de HAM F12 (1:1) + 2% FCS + % GlutaMax + 1% Pen/Strep	4000

#### Artículos de prueba y formulación

El artículo de prueba 1 fue el tripsinógeno, que fue suministrado por Applichem (Darmstadt, Alemania). El artículo de prueba 2 fue el quimotripsinógeno, que fue suministrado por BBI Enzymes (Gwent, Reino Unido). El artículo de prueba 3 fue la  $\alpha$ -amilasa, que fue suministrado por Anecis Ltd (Lancaster, Reino Unido). El artículo de prueba 4 fue la 2-desoxiglucosa, que fue suministrado por Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia). El artículo de prueba 5 fue capsaiato, que fue suministrado por Propanc Pty Ltd. El artículo de prueba 6 fue metilselenocisteína, que fue suministrado por Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia)

La  $\alpha$ -amilasa, el tripsinógeno y el quimotripsinógeno se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C para su uso posterior. El artículo de prueba DCM se compone de 2-desoxiglucosa, capsaiato y metilselenocisteína en una proporción de 1:1:0,0001. Estos tres componentes se mezclaron juntos en estas proporciones, se suspendieron de nuevo en PBS y se usaron inmediatamente después de la preparación.

#### Ensayos de crecimiento celular

Para los análisis de  $Cl_{50}$ , los artículos de prueba se agregaron a las células 24 horas después de la siembra. Las concentraciones del artículo de prueba se probaron por triplicado para cada línea celular. El ensayo CellTiter-Blue® se llevó a cabo en todas las placas 72 horas después de la adición de los artículos de prueba.

Para los ensayos de combinación, se sembraron dos placas de 96 pocillos para cada línea celular y la combinación del artículo de prueba, para permitir la replicación de cada experimento. Los artículos de prueba se agregaron a las células 24 horas después de la siembra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo (las células dentro del intervalo A3:G11 contienen la combinación de ambos fármacos en las concentraciones indicadas en la columna 2 y en la fila H). Las concentraciones iniciales para cada compuesto en cada línea celular se decidieron en función de la  $Cl_{50}$  calculada de manera que la  $Cl_{50}$  para cada fármaco se encontraba dentro de la concentración en la serie de dilución. El ensayo CellTiter-Blue® se llevó a cabo en todas las placas 72 horas después de la adición de los artículos de prueba.

Después de la incubación de células en medios que contienen el artículo de prueba, se agregaron 10  $\mu$ L de CellTiter-Blue® a cada pocillo y se incubaron con células hasta 4 horas. La fluorescencia se midió utilizando un fluorómetro Spectramax Gemini XPS. Todos los datos se registraron y se ingresaron en las hojas de cálculo de Microsoft® Excel para su interpretación.

Los datos recopilados de los ensayos CellTiter-Blue® se representaron como curvas de respuesta a la dosis para la determinación de la  $Cl_{50}$  y como isobogramas para evaluar el tipo de interacción entre las combinaciones del artículo de prueba. Para las determinaciones de  $Cl_{50}$ , se calculó la inhibición del crecimiento y se representó frente a la concentración del compuesto. En estas representaciones, el eje X (concentración del compuesto) se representó en una escala logarítmica. La concentración de  $Cl_{50}$  se calculó como la concentración inhibitoria (CI) media máxima (50%) para cada compuesto utilizando GraphPad Prism versión 5.0 para Mac OSX (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.).

Para los estudios de combinación, el análisis isoblográfico se realizó utilizando la plantilla de análisis patentada de vivoPharm. El análisis isoblográfico proporciona una medida del tipo de interacción (es decir, sinérgica, aditiva o antagonista) que ocurre entre dos compuestos. Un parámetro que define el tipo de interacción es el valor g. Como se describió anteriormente, los valores de g de más de 1,0 indican una interacción antagónica y los valores de g de menos de 1,0 indican una interacción sinérgica. Cada ensayo isoblográfico da como resultado valores de g, uno para cada concentración del segundo compuesto en la combinación (compuesto B en la plantilla de análisis). Para este estudio, las interacciones entre dos compuestos se clasificaron en tres grupos: interacciones sinérgicas de amplio intervalo que mostraron más de 7 g de valores por debajo de 1,0, interacciones sinérgicas de intervalo estrecho que dieron como resultado valores de 3 a 7 g por debajo de 1,0 e interacciones no sinérgicas que produjeron valores de menos de 3 g por debajo de 1,0. La tabla 5 muestra el resumen de todas las interacciones analizadas en este estudio.

Todos los procedimientos utilizados en la realización de este estudio se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos operativos estándar.

#### Resultados

5 Se realizaron ensayos de determinación de  $CI_{50}$  para JBp1 en 24 líneas celulares de cáncer. Como se ve en la Tabla 10, se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  para 15 de las líneas celulares (A2780, HOP-92, BxPc-3, HT-29, KYSE-30, MIAPaCa-2, OE-33, A549, HCT-15, OE-21, NCI-H82, HCT-116, MDA-MB468, NCI-H460 y BT474). Las líneas celulares restantes mostraron valores máximos de inhibición o curvas de dosis-respuesta que no permitieron la determinación de los valores de  $CI_{50}$  dentro del intervalo de concentraciones de JBp1 analizadas en este estudio. La Tabla 10 muestra los valores de  $IC_{50}$  y de inhibición de crecimiento máxima para las 24 líneas celulares en orden decreciente de inhibición de crecimiento máxima.

10 Sobre la base de la  $CI_{50}$  y los valores de inhibición máxima obtenidos para las 24 líneas celulares y la idoneidad de cada línea celular para estudios de seguimiento en animales, se seleccionaron tres líneas celulares para estudios isobolográficos. Estas líneas celulares, A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2, están resaltadas en negrita en la Tabla 10.

Tabla 10: Resumen de los valores de  $IC_{50}$  para JBp1 en 24 líneas celulares

Línea celular	$IC_{50}$ JBp1 (mg/mL)	% de inhibición máxima
A2780	0,09	93,4
HOP-92	0,13	91,1
BxPc-3	0,16	90,7
HT-29	0,04	87,6
KYSE-30	0,03	86,2
MIAPaCaCa-2	0,08	85,0
OE-33	0,15	84,1
A549	0,15	83,9
HCT-15	0,08	82,3
OE-21	0,42	68,2
NCI-H82	0,06	66,9
HCT-116	0,14	62,4
MDA-MB468	0,10	62,3
COLO-205	-	61,7
NCI-H460	0,07	58,9
BT474	0,01	55,3
SK-OV-3	-	54,5
PANC-1	-	52,8
NCI-596	-	51,4
MDA-MB-231	-	47,5
COLO-201	-	36,3
NCI-H520	-	34,0
MDA-MB-453	-	16,2
OVCAR-3	-	9,3

5 El método isobolográfico para estudiar la interacción entre compuestos requiere la determinación de los valores de  $CI_{50}$  para esos componentes antes de realizar los ensayos de combinación. Por lo tanto, se realizaron ensayos de determinación de  $CI_{50}$  para los tres componentes individuales de JBp1, a saber, tripsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa, en las tres líneas celulares seleccionadas A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2. Como se ve en la Tabla 11, el tripsinógeno mostró valores de  $CI_{50}$  que oscilaron entre 0,23 y 0,41 mg/ml en las tres líneas celulares. La  $\alpha$ -amilasa y el quimotripsinógeno no presentaron valores de  $CI_{50}$  dentro del intervalo de concentraciones analizadas.

Tabla 11 Resumen de los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento para tripsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2.

Valores $IC_{50}$ (mg/mL)			
	A-549	HCT-15	MIAPaCa-2
Tripsinógeno	0,23	0,41	0,28
Quimotripsinógeno	-	-	-
$\alpha$ -Amilasa	-	-	-
Inhibición Máxima (%)			
	A-549	HCT-15	MIAPaCa-2
Tripsinógeno	75,7	77,2	82,3
Quimotripsinógeno	26,5	16,6	28,9
$\alpha$ -amilasa	2,6	16,0	13,8

10 El análisis isobolográfico proporciona una medida del tipo de interacción (es decir, sinérgica, aditiva o antagonista) que ocurre entre dos compuestos. Un parámetro que define el tipo de interacción es el valor g. Como se describió anteriormente, los valores de g de más de 1,0 indican una interacción antagónica y los valores de g de menos de 1,0 indican una interacción sinérgica. Cada ensayo isobolográfico da como resultado valores de g, uno para cada concentración del segundo compuesto en la combinación (compuesto B en la plantilla de análisis). Para este estudio, las interacciones entre dos compuestos se clasificaron en tres grupos: interacciones sinérgicas de amplio rango que mostraron valores de más de 7 g por debajo de 1,0, interacciones sinérgicas de rango estrecho que dieron como resultado valores de 3 a 7 g por debajo de 1,0 e interacciones no sinérgicas que produjeron valores de menos de 3 g por debajo de 1,0. La tabla 8 muestra el resumen de todas las interacciones analizadas en este estudio.

15 A pesar del hecho de que no se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  para la  $\alpha$ -amilasa y el quimotripsinógeno, la interacción entre sí y con el tripsinógeno se estudió en ensayos de combinación, ya que se entiende que estos componentes aún interactúan cuando se combinan con un segundo compuesto. Las figuras 15-17 muestran los isobogramas resultantes de los ensayos de combinación entre  $\alpha$ -amilasa, tripsinógeno y quimotripsinógeno en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2.

20 Como se ve en la fig. 15 y en la Tabla 8, el tripsinógeno y el quimotripsinógeno mostraron resultados isobolográficos compatibles con un amplio rango de interacción sinérgica en células A-549 y MIAPaCa-2. En las células HCT-15, el perfil isobolográfico fue consistente con una interacción no antagonista (la línea isobolográfica se ubica casi superpuesta en el eje X y podría no ser claramente distinguible en la figura). Sobre la base de los resultados generales de los ensayos de combinación en las tres líneas celulares seleccionadas, se definió que la proporción mejorada de tripsinógeno y quimotripsinógeno en la formulación debería establecerse en 6:1 (quimotripsinógeno:tripsinógeno). Esta relación se apoya en: 1) las concentraciones más altas de quimotripsinógeno mejoraron significativamente el efecto inhibidor del crecimiento, como se refleja por los valores de g muy bajos a 1 y 2 mg/ml de quimotripsinógeno en células A-549 y MIAPaCa-2; y 2) las concentraciones de tripsinógeno por encima de 0,25 mg/ml no agregaron efectos inhibitorios adicionales. Por lo tanto, el promedio de las dos concentraciones superiores de quimotripsinógeno (1,5 mg/ml) se dividió por la concentración superior de tripsinógeno (0,25 mg/ml) para obtener una relación de 1,5 a 0,25 o 6:1.

25 La figura 16 muestra los isobogramas para la interacción entre tripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2. La combinación de estos dos compuestos dio como resultado interacciones sinérgicas en células A-549 y MIAPaCa-2 y una interacción no sinérgica en células HCT-15 (Tabla 8). La interacción positiva fue del tipo de rango amplio en células MIAPaCa-2 y del tipo de rango estrecho en células A-549. Dado el rango de respuestas observado para esta interacción en las tres líneas celulares probadas, estos datos no se utilizaron para determinar la proporción entre estos dos componentes en la formulación JBp1.

La figura 17 muestra los isobogramas para la interacción entre el quimotripsinógeno y la  $\alpha$ -amilasa en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2. La combinación de estos dos compuestos dio como resultado una interacción sinérgica en células MIAPaCa-2 e interacciones no sinérgicas en células A-549 y HCT-15. Dado el efecto negativo de la  $\alpha$ -amilasa en los efectos inhibidores del crecimiento celular del quimotripsinógeno, se decidió dejar la proporción de este componente con respecto a los otros dos componentes de JBp1 en la concentración original (1:0,25, quimotripsinógeno: $\alpha$ -amilasa).

En resumen, después de la primera ronda de ensayos de combinación, se determinó que la relación quimotripsinógeno:tripsinógeno se establecería en 6:1 y las proporciones de quimotripsinógeno: $\alpha$ -amilasa y tripsinógeno: $\alpha$ -amilasa se utilizarían en las concentraciones originales de 1:0,25.

Para la segunda ronda de estudios de combinación, el par de compuestos y la proporción definida anteriormente se redefinieron como los nuevos compuestos de prueba de la siguiente manera:

- Quimotripsinógeno:tripsinógeno (6:1) = TC
- Quimotripsinógeno: $\alpha$ -amilasa (1:0,25) = CA
- Tripsinógeno: $\alpha$ -amilasa (1:0,25) = TA

Se realizaron ensayos de determinación de  $CI_{50}$  para estos compuestos redefinidos en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2. La Tabla 12 presenta las curvas de dosis-respuesta y los valores de  $CI_{50}$  calculados y la inhibición máxima del crecimiento para los tres compuestos en las tres líneas celulares seleccionadas. Los valores de  $CI_{50}$  se obtuvieron para TC y TA en las tres líneas celulares. Sin embargo, no se pudieron encontrar valores de  $CI_{50}$  para CA dentro del intervalo de concentraciones analizadas.

Tabla 12: Resumen de los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento para TC, TA y CA en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2.

Valores $CI_{50}$ (mg/mL)			
	A-549	HCT-15	MIAPaCa-2
TC	0,61	0,28	0,33
TA	0,59	0,37	0,61
CA	-	-	-
Inhibición máxima (%)			
TC	88,3	87,1	88,9
TA	86,7	84,8	83,1
CA	51,3	31,3	33,9

Después de la determinación de los valores de  $CI_{50}$  para TC, CA y TA, se realizaron ensayos combinados entre estos tres componentes y el tercer componente correspondiente en la formulación JBp1 (es decir, TA versus quimotripsinógeno, CA versus tripsinógeno y TC versus  $\alpha$ -amilasa).

La figura 18 presenta los isobogramas para la combinación entre TA y quimotripsinógeno. La combinación de estos dos compuestos dio como resultado interacciones sinérgicas en células A-549 y MIAPaCa-2 y una interacción no sinérgica en células HCT-15.

La figura 19 presenta los isobogramas para la combinación entre CA y tripsinógeno. La combinación de estos dos compuestos dio como resultado interacciones sinérgicas en células HCT-15 y MIAPaCa-2 y una interacción no sinérgica en células A-549. En general, la tendencia observada apuntó hacia una interacción positiva para estos dos componentes, consistente con la interacción sinérgica observada entre el quimotripsinógeno y el tripsinógeno. Estos resultados justifican aún más la relación 6:1 (quimotripsinógeno:tripsinógeno) seleccionada en base a los resultados anteriores discutidos.

La figura 20 presenta los isobogramas para la interacción entre TC y  $\alpha$ -amilasa. La tendencia general observada para esta combinación fue consistente con interacciones no sinérgicas. Para diseccionar aún más este efecto negativo de la  $\alpha$ -amilasa sobre los efectos inhibidores del crecimiento de la TC, los valores de  $CI_{50}$  para la TC se extrajeron de la plantilla de análisis isoblográfico y se representaron frente a la concentración correspondiente de la  $\alpha$ -amilasa. Los valores aumentaron proporcionalmente a la concentración de  $\alpha$ -amilasa para las tres líneas celulares.

Estos resultados sugieren que los niveles de  $\alpha$ -amilasa en la formulación de JBp1 deben mantenerse bajos para evitar posibles efectos antagónicos con quimotripsinógeno y tripsinógeno.

La Tabla 8 anterior resume todos los resultados de la combinación de los componentes individuales y duales entre sí.

5 Sobre la base de los estudios de combinación descritos anteriormente, las proporciones de quimotripsinógeno, tripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa en la formulación de JBp1 se definieron como 6:1:0,25 (quimotripsinógeno:tripsinógeno: $\alpha$ -amilasa). Esta formulación mejorada de JBp1 fue identificada por el sufijo "vP" para diferenciarla de la formulación original de JBp1.

10 Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron para la formulación mejorada JBp1vP y se compararon con los valores obtenidos para la formulación original JBp1. La Tabla 13 presenta las curvas de dosis-respuesta, los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento para estas dos formulaciones en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2. Como muestran estos resultados, la formulación mejorada de JBp1vP presentó valores de  $CI_{50}$  más bajos que JBp1 en células A-549 y HCT-15 y un valor de  $CI_{50}$  similar en células MIAPaCa-2. Es importante destacar que JBp1vP mostró valores de inhibición de crecimiento máximos más altos que JBp1 en las tres líneas celulares.

15 Tabla 13: Resumen de los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento para JBp1, JBp1vP y DCM en células MIAPaCa-2

valores de $CI_{50}$ (mg/mL)			
	A-549	HCT-15	MIAPaCa-2
JBp1	0,51	-	0,30
JBp1vP	0,33	0,36	0,37
DCM	1,5	0,4	0,15
Inhibición máxima (%)			
	A-549	HCT-15	MIAPaCa-2
JBp1	65,4	35,2	81,0
JBp1vP	82,5	75,1	90,2
DCM	92,8	92,9	94,2

20 Se examinó JBp1vP por su capacidad para inhibir el crecimiento celular en combinación con el compuesto de prueba DCM. Antes de los ensayos de combinación, la  $CI_{50}$  de DCM se determinó en células A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2. Como se ve en las Tablas 8 y 13, el DCM mostró valores de  $CI_{50}$  en el intervalo de 0,15 a 1,5 mg/ml y valores de inhibición de crecimiento máximo de más del 92% para las tres líneas celulares.

25 La figura 14 muestra los isobogramas para la combinación entre JBp1vP y DCM. El análisis isobolográfico mostró que la interacción entre estos dos componentes en las células A-549 y HCT-15 no fue sinérgica. En las células MIAPaCa-2, la combinación de JBp1vP y DCM dio como resultado una interacción sinérgica de rango estrecho, específicamente a concentraciones más bajas de DCM. Los valores de  $g$  para este estudio de combinación estuvieron muy por debajo de 1,0 para las dos concentraciones más bajas de DCM.

En vista de que se entendió que M puede proporcionar un efecto antagonista en JBp1, estos resultados demostraron inesperadamente que DCM es eficaz en combinación con JBp1.

30 En resumen, JBp1vP y DCM interactuaron sinérgicamente a bajas concentraciones de DCM, JBp1vP también muestra efectos inhibidores del crecimiento de células cancerosas mejores respecto a la formulación de JBp1 in vitro, y JBp1vP y DCM sinergizan para inhibir el crecimiento de células cancerosas in vitro.

Ejemplo 2: Estudio in vivo de mejores formulaciones de proenzimas

35 Se realizó un estudio para determinar la eficacia anti-angiogénica in vivo de JBp1 (tripsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa), administrado a 0,13 mg/kg, 0,78 mg/kg y 0,03 mg/kg, respectivamente), solo y en combinación con un adyuvante, fue investigado DCM (2-Desoxiglucosa, Capsiato y Metilselenocisteína a 30,55 mg/kg, 29,12 mg/kg, 0,003 mg/kg, respectivamente) usando el ensayo de AngioChamber™ de vivoPharm. El ensayo AngioChamber™ utiliza el proceso fisiológico normal de cicatrización de heridas para promover la formación de cápsulas fibrosas alrededor de una cámara implantada (Wood, JM, Bold, G., Buchdunger, E., Cozens, R., et al. "PTK787/ZK 222584, a

Novel and Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Tyrosine Kinases, Impairs Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Responses and Tumour Growth After Oral Administration". *Cancer Research*, 60 (8):2178-2189 (2000)). La inclusión del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en la cámara apoya la formación de cápsulas de fibras al tiempo que induce el desarrollo de vasos sanguíneos. Por lo tanto, este sistema se utiliza para evaluar la eficacia de los tratamientos anti-angiogénicos mediante la medición de la formación de cápsulas fibrosas (peso húmedo de la cápsula en la terminación).

#### Resumen

Cincuenta ratones FvB hembra recibieron cada uno un AngioChamber™ implantado por vía subcutánea, con o sin bFGF. Diez ratones fueron seleccionados al azar e implantados con Chambers sin bFGF. Cuarenta ratones que se implantaron con Chambers que contenían bFGF se asignaron al azar por peso corporal en cuatro grupos de tratamiento de 10 ratones el día 0 del estudio.

JpB1 consistió en tripsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa, administrados a 0,13 mg/kg, 0,78 mg/kg y 0,03 mg/kg, respectivamente. El DCM consistió en 2-desoxiglucosa, capsato y metilselenocisteína a 30,55 mg/kg, 29,12 mg/kg, 0,003 mg/kg, respectivamente.

Los ratones de cada grupo recibieron un tratamiento diario (días 0 a 4) con Vehículos Control (NMP:PEG300 (1:9, v/v), po, 5 ml/kg), JBp1 (i.p., en un volumen de dosificación de 10 mL/kg), JBp1-DCM (i.p., en un volumen de dosificación de 10 mL/kg) o Sorafenib (60 mg/kg, p.o., en un volumen de dosificación de 5 mL/kg). El vehículo control se administró a dos grupos, uno de los cuales se implantó con AngioChambers™ cargado sin bFGF (Control de la línea de base), el otro se implantó con AngioChambers™ con bFGF (Control de inducción). Los grupos de tratamiento de los compuestos se implantaron con AngioChambers™ cargado con bFGF.

Las mediciones del peso corporal se registraron para todos los animales en el primer día de tratamiento (Día 0) y luego diariamente hasta el día de finalización del estudio (Día 5).

Los ratones en todos los grupos perdieron peso corporal inmediatamente después del inicio del tratamiento, un resultado esperado del procedimiento quirúrgico. Los ratones tratados con vehículo control (con bFGF) JBp1 y JBp1-DCM recuperaron el peso corporal durante la duración restante del estudio, sin una pérdida significativa del peso corporal medio en el día de la terminación. El peso corporal no se recuperó en los ratones tratados con el vehículo control (sin bFGF) y Sorafenib, y ambos grupos tuvieron una pérdida de peso corporal significativa al finalizar el estudio, lo cual es común en los ratones tratados con NMP:PEG300.

Se extirparon AngioChambers™ de cada ratón 24 horas después del tratamiento final (día 5). Se retiró la cápsula fibrosa alrededor de la cámara y se registró el peso húmedo.

Todos los tratamientos dieron como resultado una inhibición significativa de la angiogénesis inducida por bFGF en comparación con el Control de Inducción, como lo indican los pesos húmedos de la cápsula en el día de finalización del estudio. El tratamiento con JBp1-DCM y Sorafenib, que es un comparador efectivo de fármacos angiogénicos, redujo significativamente la angiogénesis en comparación con la monoterapia con JBp1. No hubo diferencias significativas en la actividad anti-angiogénica entre JBp1-DCM y sorafenib. Por lo tanto, en este modelo, tanto JBp1 como JBp1-DCM fueron eficaces en la inhibición de la formación de cápsulas fibrosas. La adición de DCM a la formulación JBp1 dio como resultado una inhibición mejorada en comparación con JBp1 solo. El tratamiento de JBp1-DCM fue tan eficaz como Sorafenib en este modelo.

#### Materiales y métodos

La heparina, NMP, PBS y PEG300 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia). Se obtuvieron filtros Acrodisc de 0,22  $\mu$ m de Pall Corporation (Sydney, NSW, Australia). El bFGF humano recombinante se obtuvo de Shenandoah Biotechnology (Warwick, PA, EE.UU.). AngioChambers™ fue suministrado por Angst + Pfister AG (Stuttgart, Alemania). La agarosa fue suministrada por Omnigel Lo.M (Edwards Instruments Co., NSW, Australia).

El sistema de prueba incluyó 50 ratones FvB hembras, con 5 grupos de estudio de 10 ratones por grupo (2 grupos control y 3 grupos de tratamiento). Se utilizaron condiciones y regímenes estándar para el control de los animales.

Se utilizaron cámaras de tejido poroso (AngioChambers™) hechas de perfluoro-alcoxi-teflón (Teflon®-PFA, 21 mm x 8 mm de diámetro, 550  $\mu$ L de volumen), perforadas con 80 orificios de 0,8 mm espaciados regularmente. Ambos extremos fueron sellados con tapas extraíbles del mismo material. Las cámaras se llenaron en condiciones estériles con agarosa al 0,8% que contenía 20 UI/ml de heparina, con o sin 4  $\mu$ g/ml de bFGF. La solución de agarosa se mantuvo a 37°C antes de llenar las cámaras.

Para la implantación de la cámara, los ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano. Se realizó una pequeña incisión en la piel dorsal central de cada ratón y la cámara se insertó por vía subcutánea y se colocó entre los omóplatos. La herida se cerró con dos clips de 1,4 mm (Michel Clip).

## Compuestos de prueba y formulaciones

El vehículo control fue NMP:PEG300 (1:9 v/v). JpB1 era el artículo de prueba 1 y consistía en tripsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa, administrados a 0,13 mg/kg, 0,78 mg/kg y 0,03 mg/kg, respectivamente. El DCM fue el artículo de prueba 2 y consistió en 2-desoxiglucosa, capsiato y metilselenocisteína a 30,55 mg/kg, 29,12 mg/kg, 0,003 mg/kg, respectivamente. Cada compuesto se disolvió por separado en PBS. Las soluciones madre se esterilizaron por filtración (0,22  $\mu$ M). En cada día de dosificación, las existencias se mezclaron en las combinaciones apropiadas.

Sorafenib fue el compuesto de referencia y se suministró en comprimidos de 315 mg que contenían 200 mg de Sorafenib activo. Las tabletas se trituraron y se disolvieron en NMP para formular una solución madre de Sorafenib activo, que se diluyó con PEG300 para lograr la concentración de dosis requerida con una relación final de NMP:PEG300 de 1:9.

Diez ratones fueron seleccionados al azar e implantados con Chambers sin bFGF. Cuarenta ratones que fueron implantados con Chambers que contenían bFGF fueron asignados al azar por peso corporal en cuatro grupos de tratamiento de 10 ratones en el día 0 del estudio. Los tratamientos comenzaron el día 0 (2 horas después de que los ratones se recuperaran de la cirugía) y se continuaron durante cinco días consecutivos (día 0 a 4).

El vehículo control (NMP:PEG300 (1:9 v/v)) (Grupos 1 y 2) y Sorafenib (60 mg/kg; Grupo 5) se administraron por vía oral (p.o.) en un volumen de dosificación de 5 ml/kg. JBp1 (tripsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa a 0,13 mg/kg, 0,78 mg/kg y 0,03 mg/kg, respectivamente) se administró solo (Grupo 3) y en combinación con DCM (2-Desoxiglucosa, Capsiato y Metilselenocisteína a 30,55 mg/kg, 29,12 mg/kg, 0,003 mg/kg, respectivamente) (Grupo 4). Ambos se administraron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Cuando JBp1 y DCM se administraron en combinación, los seis compuestos se formularon y se administraron juntos en la única inyección.

El peso corporal de cada animal se midió inmediatamente antes de la dosificación. El volumen de la solución de dosificación administrada a cada animal se calculó y ajustó en función del peso corporal individual.

Los animales se trataron de acuerdo con el programa anterior, comenzando 2 horas después de que los ratones se recuperaran de la cirugía para implantar el AngioChamber™ en el día 0 del estudio. Los AngioChambers™ se eliminaron de todos los ratones post mortem en el día de finalización (Día 5). La cápsula fibrosa vascularizada que se había formado alrededor de cada cámara se retiró con cuidado y el peso húmedo se registró de inmediato.

El tratamiento de cualquier animal cesaría si su peso corporal bajara a menos del 85% desde el del ingreso al estudio. Si esto ocurriera, las mediciones de peso corporal continuarían por un período corto. Si no se medía la ganancia de peso corporal, entonces el animal era sacrificado. Los animales también se sacrificaban si se observaba una reacción adversa grave al tratamiento. El grado de la reacción adversa se evaluaba utilizando una hoja de puntuación clínica pro-forma que enumeraba los síntomas y una puntuación adjunta (guía incluida en el Apéndice 2). La combinación de los síntomas observados y el puntaje total resultante determinaron el curso de acción a tomar con respecto al bienestar del animal.

La inhibición de la angiogénesis por los artículos de prueba (%) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(A - B)/(A - C) \times 100]$$

donde A es el peso medio de la cápsula de ratones con AngioChambers™ implantado que contenían el factor de crecimiento y tratados con el Vehículo control (Grupo 2).

B es el peso medio de la cápsula de ratones con AngioChambers™ implantado que contenían el factor de crecimiento y tratados con el Artículo de prueba (Grupos 3-5),

y C es el peso promedio de la cápsula de ratones con AngioChambers™ implantado sin factor de crecimiento y tratados con Vehículo control (Grupo 1).

Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando SigmaStat 3.0 (SPSS Australasia, North Sydney, NSW, Australia). Se usó una prueba t pareada para determinar la importancia en el cambio de peso corporal dentro de un grupo de tratamiento entre el Día 0 y el día de finalización del estudio. Cuando los datos no pasaron la prueba de normalidad, se realizó la prueba de suma de intervalos firmada de Wilcoxon. El objetivo de los análisis estadísticos restantes fue mostrar que el compuesto de referencia, Sorafenib y los Artículos de prueba inhibían significativamente la inducción de la cápsula fibrosa por bFGF. Se considera esencial la inducción significativa de la formación de la cápsula fibrosa por bFGF para aceptar los resultados del estudio. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) en los datos de peso de la cápsula al final del estudio. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizaron los procedimientos de los grupos de comparación múltiple de todos los pares y comparación múltiple versus control (método de Holm-Sidak). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo.

Todos los procedimientos utilizados en la realización de este estudio se llevaron a cabo de acuerdo con los

Procedimientos Operativos Estándar de vivoPharm, con referencia particular a SOP N°. vP\_EF0317 "General Procedures for Angiogenesis Studies". Los procedimientos operativos estándar se mantienen archivados en las instalaciones seguras de vivoPharm.

#### Resultados y observaciones

5 Todos los ratones en todos los grupos presentaron piloerección durante la duración del estudio. Un ratón tratado con Vehículo control (con bFGF; Grupo 2) fue encontrado muerto el Día 1 del estudio, probablemente debido a complicaciones de la cirugía. Un ratón tratado con Vehículo control (sin bFGF; Grupo 1) tenía la pata trasera derecha adherida al pelaje abdominal el día 4. Este se separó bajo anestesia por inhalación.

10 Los ratones en todos los grupos perdieron peso corporal inmediatamente después del inicio del tratamiento, probablemente debido al procedimiento quirúrgico. Los ratones tratados con Vehículo control (con bFGF; Grupo 2) JBp1 (Grupo 3) y JBp1-DCM (Grupo 4) recuperaron constantemente el peso corporal durante la duración restante del estudio, sin pérdida significativa de peso corporal medio en el día de finalización.

15 El peso corporal no se recuperó en ratones tratados con Vehículo control (sin bFGF; Grupo 1) y Sorafenib (Grupo 5), con ambos grupos con una pérdida significativa de peso corporal (5,5% y 5,6%, respectivamente) al finalizar el estudio.

El peso húmedo de la cápsula fibrosa está impulsado principalmente por la extensión de la angiogénesis inducida por el bFGF capturado en los AngioChambers™ y, posteriormente, por la estimulación del VEGF endógeno. Una cápsula fibrosa pequeña o ligera se correlaciona con un pequeño grado de formación de vasos sanguíneos en el interior y, por lo tanto, una inhibición más alta de la angiogénesis por un tratamiento particular.

20 En este estudio, la formación de cápsulas fibrosas de las cápsulas escindidas fue significativamente mayor en el grupo de Vehículo control con bFGF cargado en la cámara (Grupo 2, Control de Inducción) que en el grupo de Vehículo control sin bFGF cargado en la cámara (Grupo 1, Control de Línea de Base) (Figura 21), lo que indica que bFGF estimuló adecuada y significativamente la formación de cápsulas.

25 Como todos los grupos de tratamiento tenían bFGF cargado en la cámara, todas las comparaciones con el grupo de Vehículo control discutidas a continuación se refieren al Control de Inducción, Grupo 2 (con bFGF cargado en la cámara).

30 La figura 21 muestra los resultados de las pruebas para los grupos 1-5. El grupo 1 es Vehículo control (NMP:PEG300 (1:9, v/v)) sin bFGF. El grupo 2 es Vehículo control (NMP:PEG300 (1:9, v/v)), con bFGF. El grupo 3 es JBp1\*, con bFGF. El grupo 4 es JBp1-DCM\*, con bFGF. El grupo 5 es sorafenib, 60 mg/kg, con bFGF. El símbolo de referencia "a" significa significativamente diferente al Control de Inducción (Vehículo control con bFGF (Grupo 2)) ( $p < 0,05$ ; ANOVA de una vía). El símbolo de referencia "b" significa significativamente diferente a la monoterapia con JBp1 (con bFGF) (Grupo 3) ( $p < 0,05$ ; ANOVA de una vía). Todos los tratamientos se administraron una vez al día durante 5 días (día 0-4).

35 El tratamiento con JBp1, JBp1-DCM y Sorafenib (Grupos 3, 4 y 5, respectivamente) produjo una reducción significativa en la angiogénesis en comparación con el Control de Inducción (Grupo 2), como lo indica la diferencia en el peso de la cápsula (Figura 21). El tratamiento con JBp1-DCM y Sorafenib (Grupos 4 y 5, respectivamente) redujo significativamente la angiogénesis en comparación con la monoterapia con JBp1 (Grupo 3).

40 Las cámaras recolectadas de ratones tratados con JBp1 solo (Grupo 3) tenían más sangre libre en el espacio entre la cápsula fibrosa y la cámara que las tratadas con JBp1-DCM (Grupo 4). La cápsula fibrosa alrededor de las cámaras recolectadas de ratones tratados con JBp1-DCM (Grupo 4) era más rígida que la tratada con Vehículo control (sin y con bFGF; Grupo 1 y 2, respectivamente).

#### Conclusión

45 La eficacia anti-angiogénica in vivo del tratamiento intraperitoneal con JBp1 (tripsinógeno (0,13 mg/kg), quimotripsinógeno (0,78 mg/kg) y  $\alpha$ -amilasa (0,03 mg/kg), administrada sola y en combinación con DCM (2-desoxiglucosa (30,55 mg/kg), Capsiato (29,12 mg/kg) y Metilselenocisteína (0,003 mg/kg) se investigó en ratones FvB hembras utilizando el ensayo vivo Pharm's AngioChamber™. El efecto de los artículos de prueba se comparó con el de un compuesto de referencia, Sorafenib (60 mg/kg, p.o.).

50 En este estudio, todos los tratamientos dieron como resultado una inhibición significativa de la angiogénesis inducida por bFGF en comparación con el control de inducción, como lo indican los pesos húmedos de la cápsula en el día de finalización del estudio. Tanto el compuesto de referencia, Sorafenib, como la combinación de JBp1-DCM redujeron significativamente la angiogénesis en comparación con la monoterapia con JBp1. Por lo tanto, se ha demostrado que JBp1-DCM es eficaz para reducir la angiogénesis.

#### Ejemplo 3: Estudio in vitro de formulaciones de proenzimas

Se realizó un estudio para determinar el efecto de la formulación de proenzima que comprende tripsinógeno (pT),

quimotripsinógeno (pC) y  $\alpha$ -amilasa (A) (formulación denominada JBp1vP) con agentes activos de metilselenocisteína (M), capsiato (C) o 2-desoxiglucosa (D). El estudio aplicó el método isobolográfico para comprender la interacción entre estos componentes.

Resumen

5 Se estudiaron las propiedades inhibitorias del crecimiento celular de estas formulaciones de proenzimas. Sobre la base de los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento, se seleccionaron tres líneas celulares, A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2 para los estudios de combinación utilizando el método isobolográfico. El uso de isobogramas permitió el estudio del nivel de interacción entre los tres componentes individuales y JBp1vP. Al estudiar la actividad de inhibición del crecimiento de los componentes individuales en combinación entre sí y como mezclas con JBp1vP, se identificaron formulaciones mejoradas. Los resultados de estas formulaciones mejoradas se muestran en las Figs. 22-24, que proporcionan un análisis isobolográfico para JBp1vP e individualmente M, C y D, respectivamente, en células HCT-15.

Ejemplo 4: Estudio in vitro de formulaciones que contienen 2-desoxiglucosa y metilselenocisteína

15 Se realizó un estudio para determinar el efecto de una formulación que comprende metilselenocisteína (M) y 2-desoxiglucosa (D). El estudio aplicó el método isobolográfico para comprender la interacción entre estos componentes.

Resumen

20 Se estudiaron las propiedades inhibitorias del crecimiento celular de estas formulaciones de proenzimas. Basándose en los valores de  $CI_{50}$  y la inhibición máxima del crecimiento, se seleccionaron tres líneas celulares, A-549, HCT-15 y MIAPaCa-2 para el estudio de combinación utilizando el método isobolográfico. El uso de isobogramas permitió el estudio del nivel de interacción entre estos dos componentes. Al estudiar la actividad de inhibición del crecimiento de los componentes individuales y en combinación entre sí, se identificó una formulación mejorada. Los resultados de la formulación mejorada se muestran en la FIG. 25, que proporciona un análisis isobolográfico para la combinación M y D en células HCT-15.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende tripsinógeno y quimotripsinógeno, en la que la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno es 4:1, 8:1 o está en el intervalo de 4:1 a 8:1.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición no contiene amilasa.
- 5 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está entre 5:1 y 7:1.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsina es 6:1.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende tripsinógeno y quimotripsinógeno para usar en un método para tratar el cáncer, en donde la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno es 4:1, 8:1 o está en el intervalo de 4:1 a 8:1.
6. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 5, en la que la composición no contiene amilasa.
7. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 5 ó 6, en la que la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno está entre 5:1 y 7:1.
- 15 8. La composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que la relación en peso de quimotripsinógeno:tripsinógeno es 6:1.
- 20 9. La composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de intestino, cáncer de próstata, cáncer de estómago, melanoma maligno, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón y cáncer de mama.

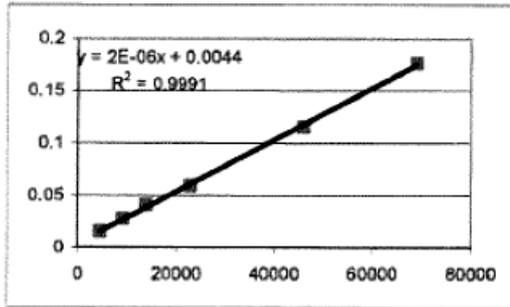


Figura 1A: curva estándar de células Caco2

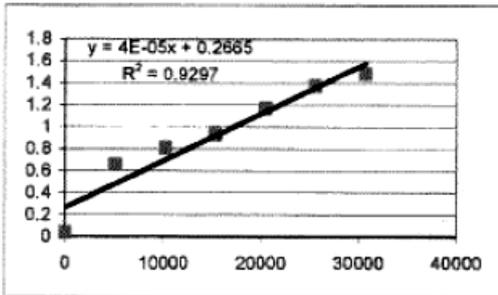


Figura 1B: curva estándar de células HEK293

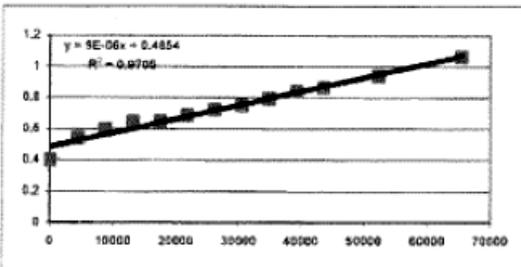


Figura 1C: curva estándar de células OE33

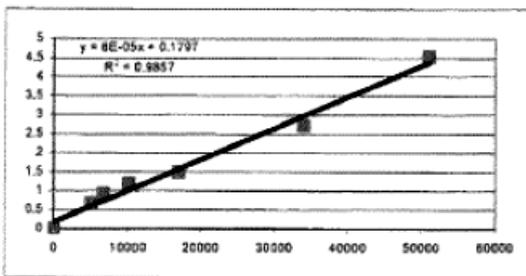


Figura 1D: curva estándar de células Panc1

FIGURAS 1 A-D

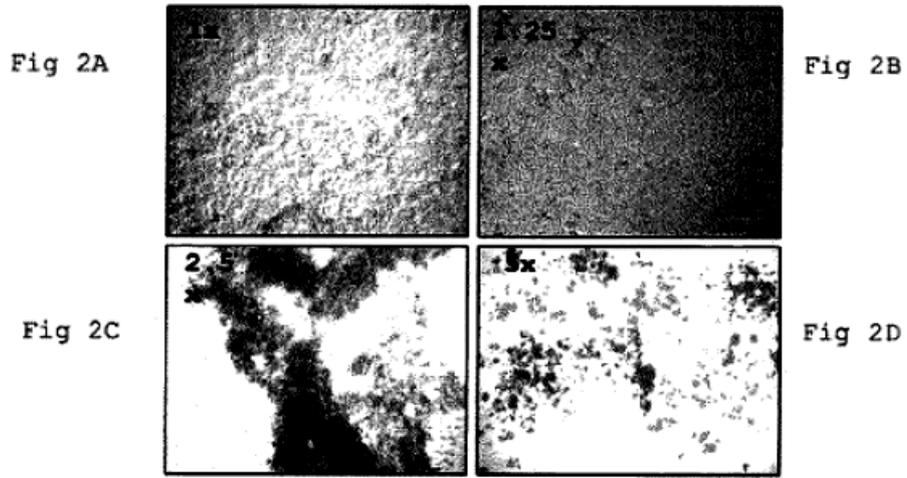


FIGURA 2

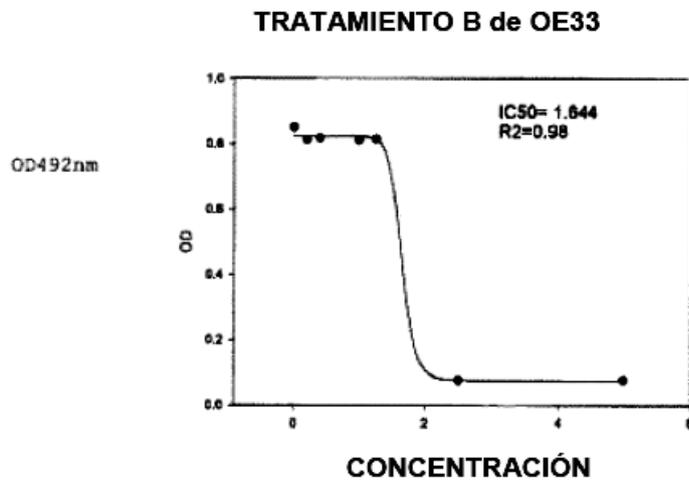
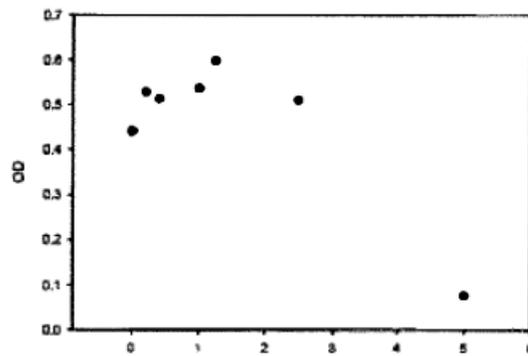
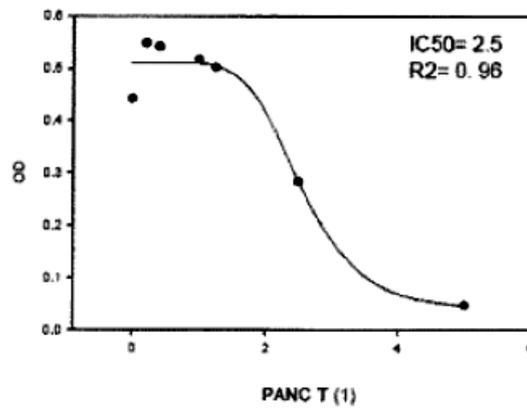
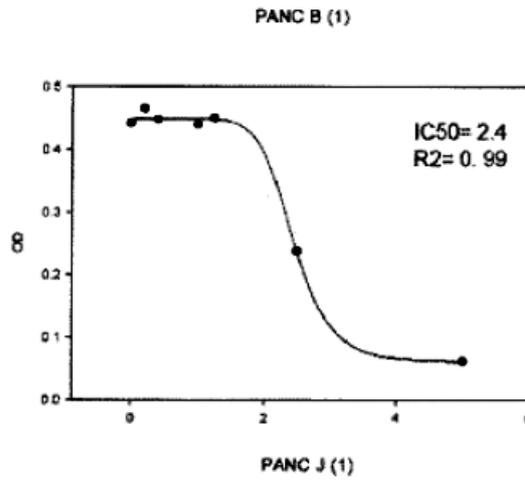


FIGURA 3



FIGURAS 4A-C

Tratamiento CACO B

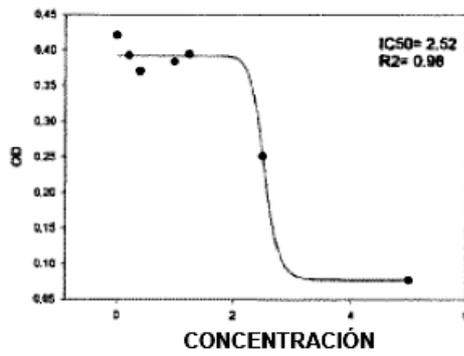


Figura 5A: Tratamiento B

Tratamiento CACO J

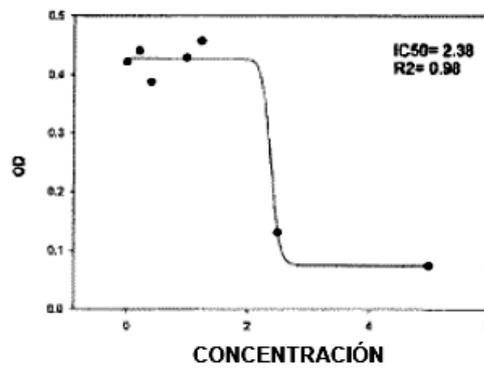


Figura 5B: Tratamiento J

Tratamiento CACO

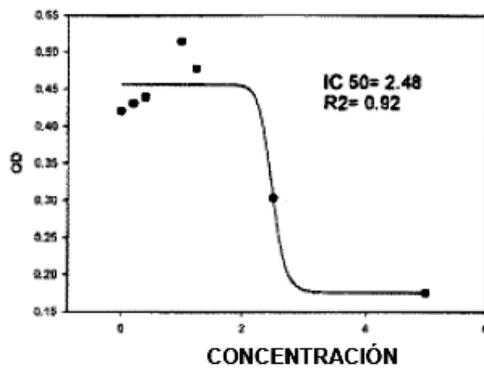


Figura 5C: Tratamiento T

FIGURAS 5A-C

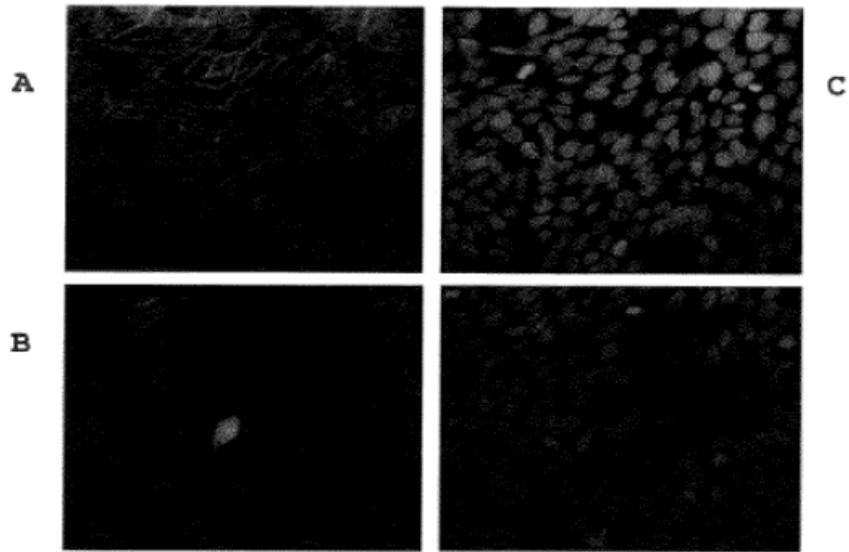


FIGURA 6A

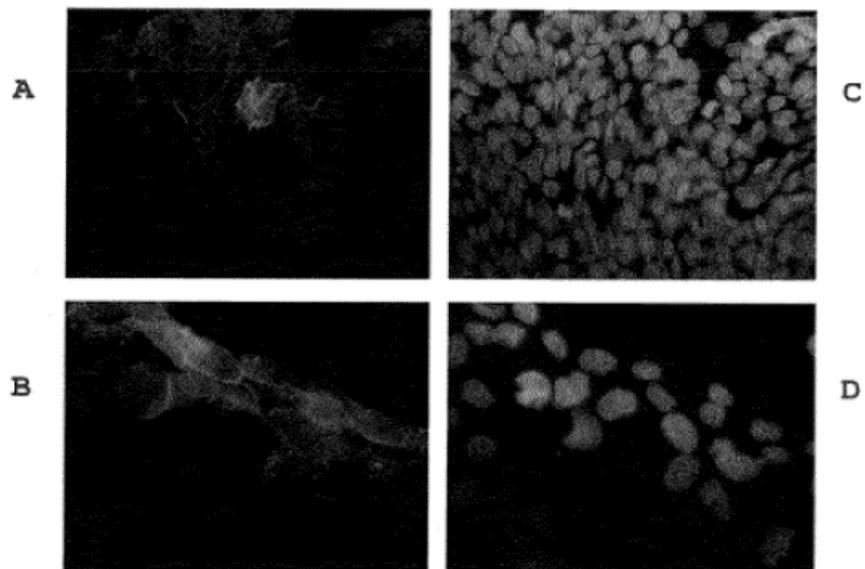


FIGURA 6B

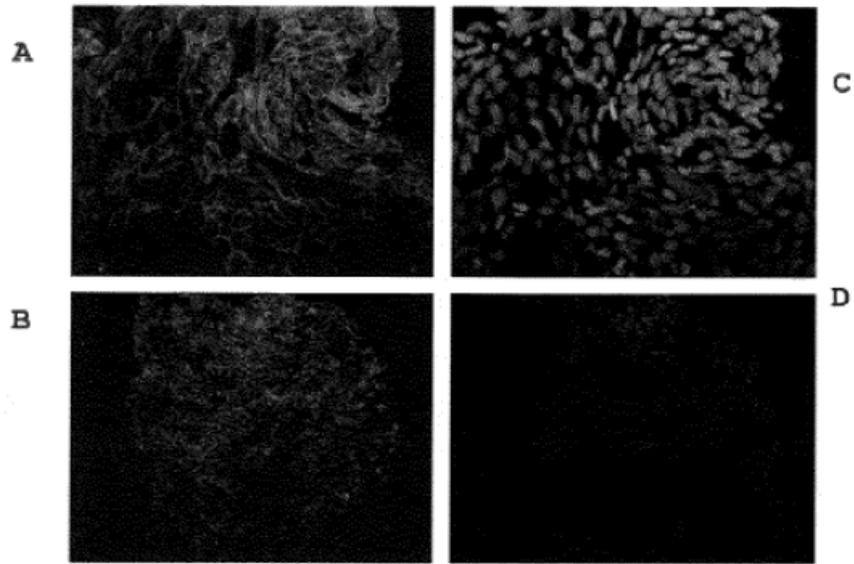


FIGURA 7A

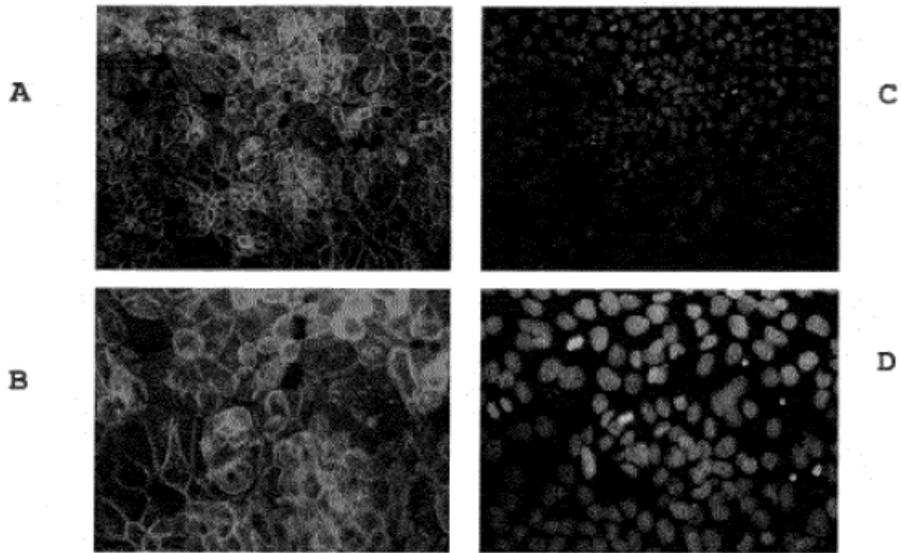


FIGURA 7B

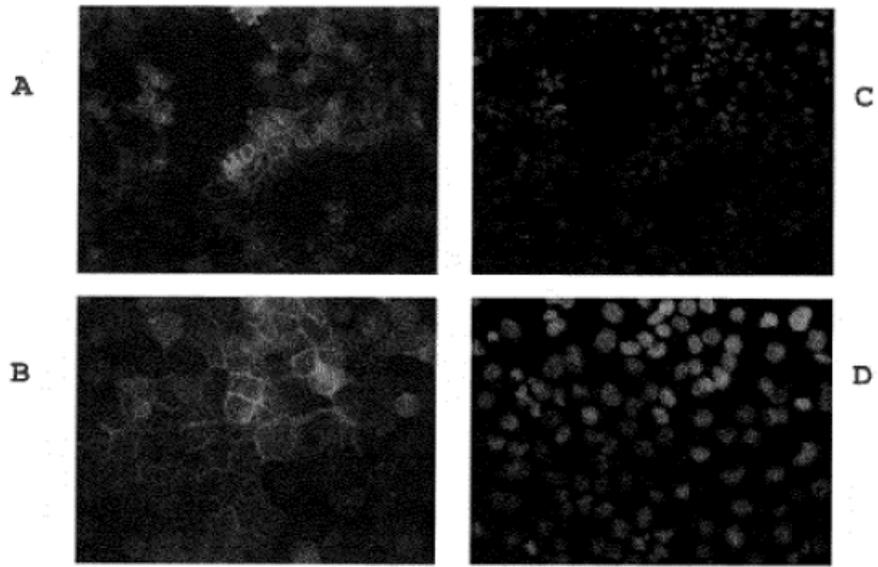


FIGURA 8A

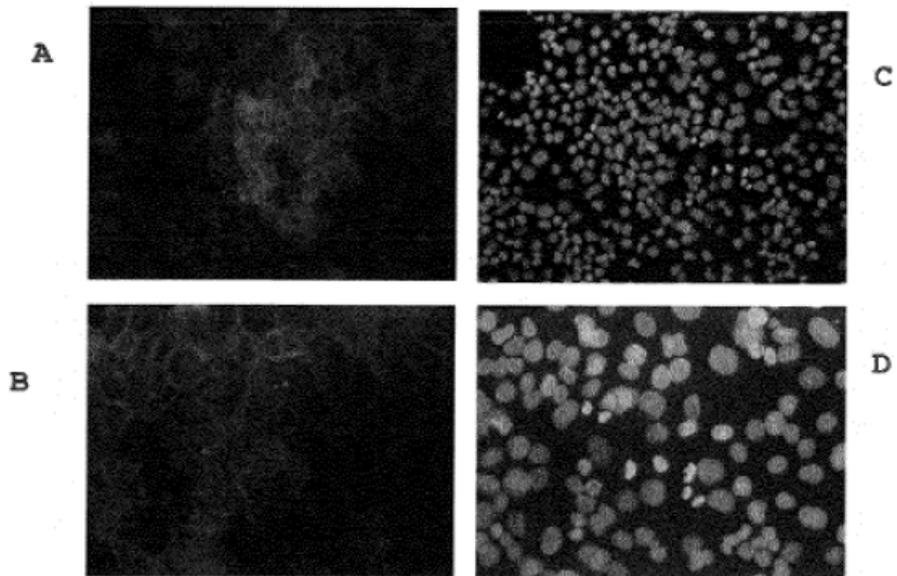


FIGURA 8B

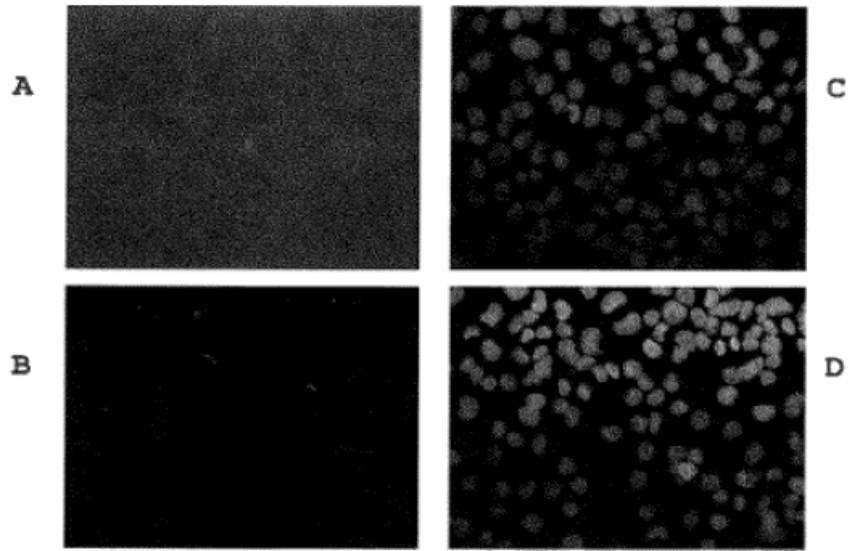


FIGURA 9A

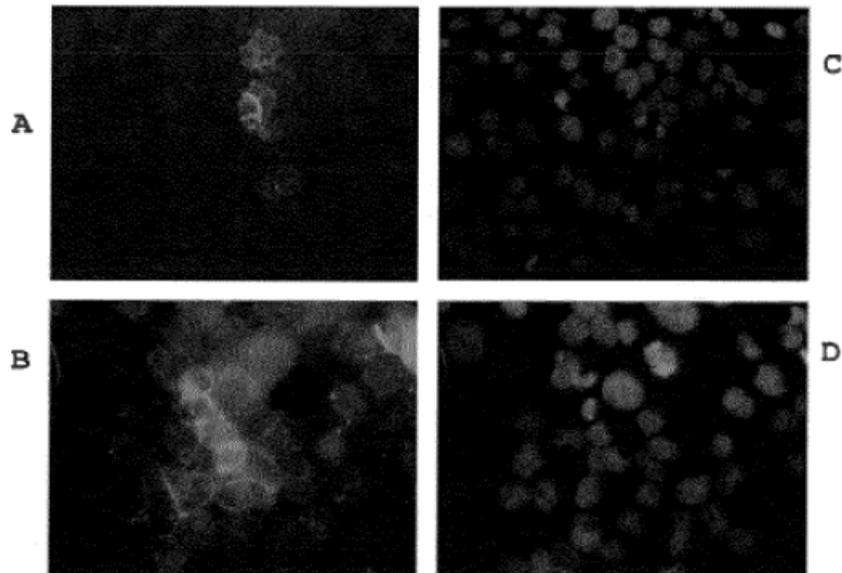


FIGURA 9B

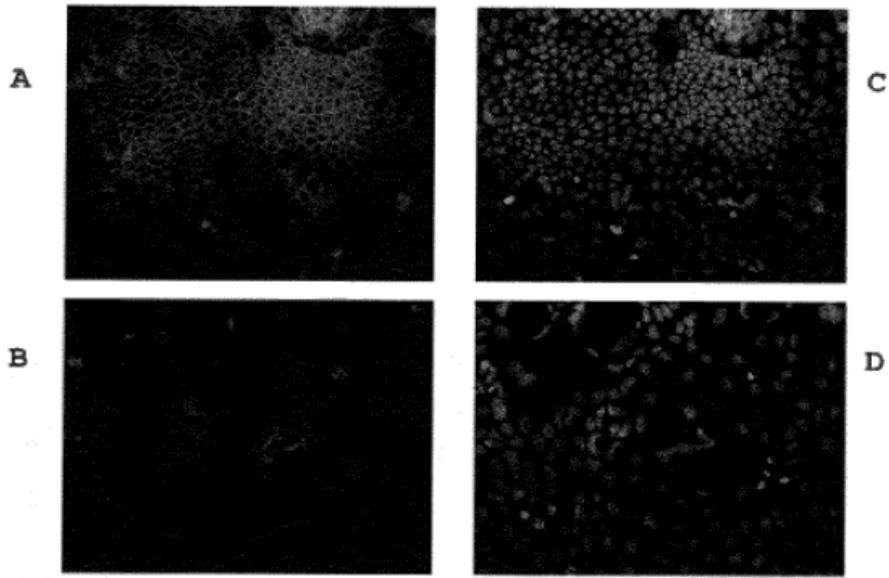


FIGURA 10A

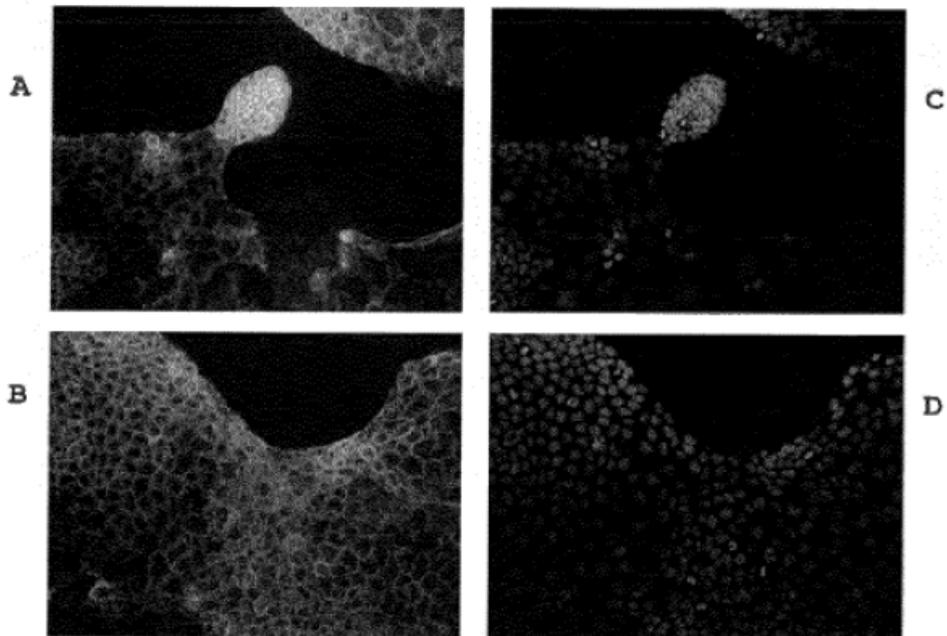


FIGURA 10B

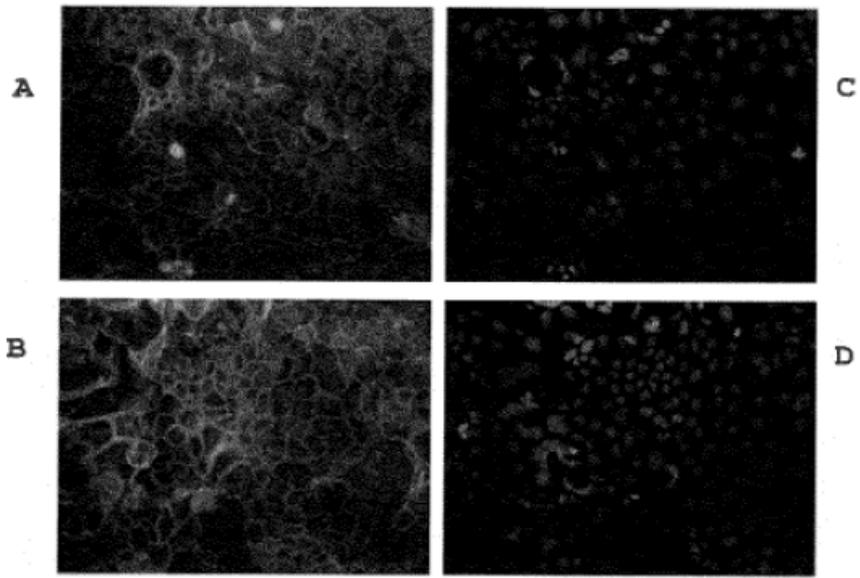


FIGURA 11A

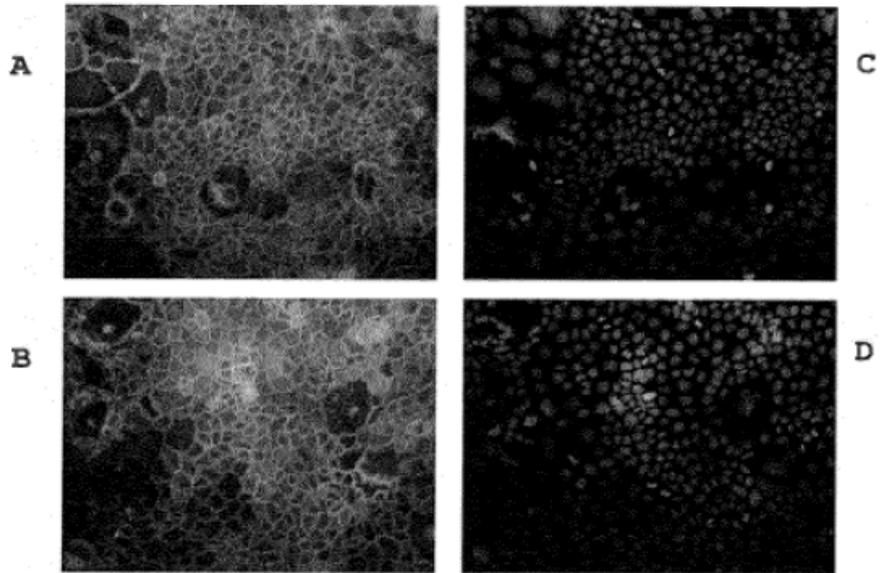


FIGURA 11B

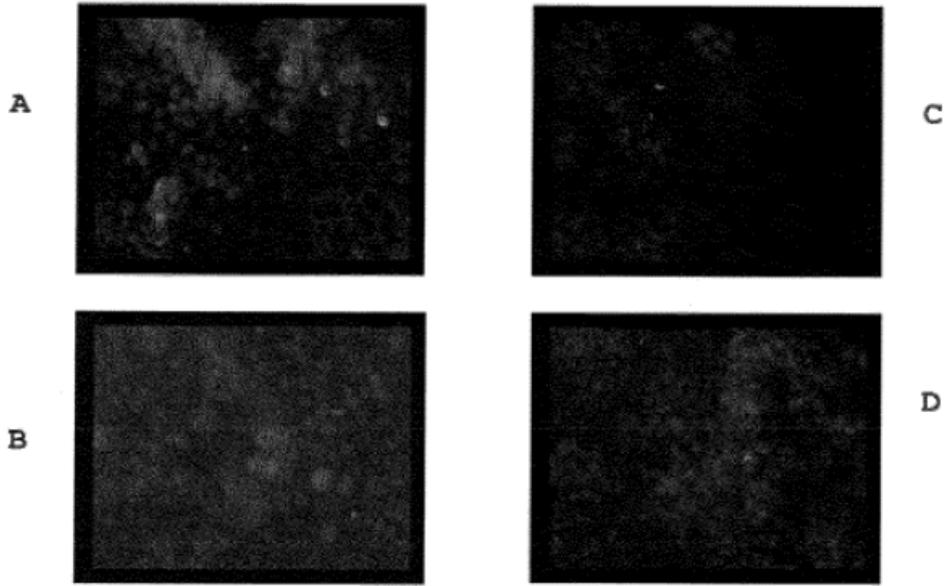


FIGURA 12

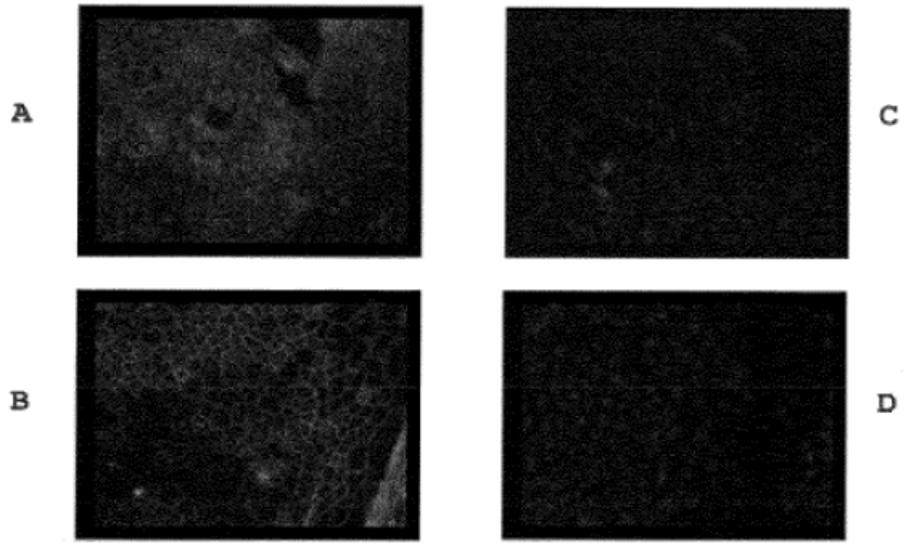
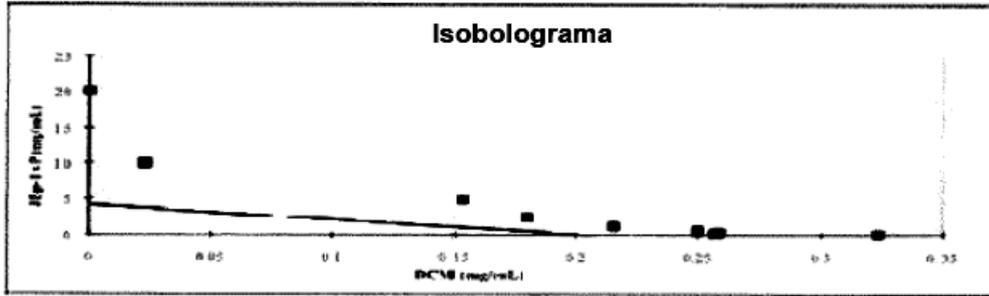
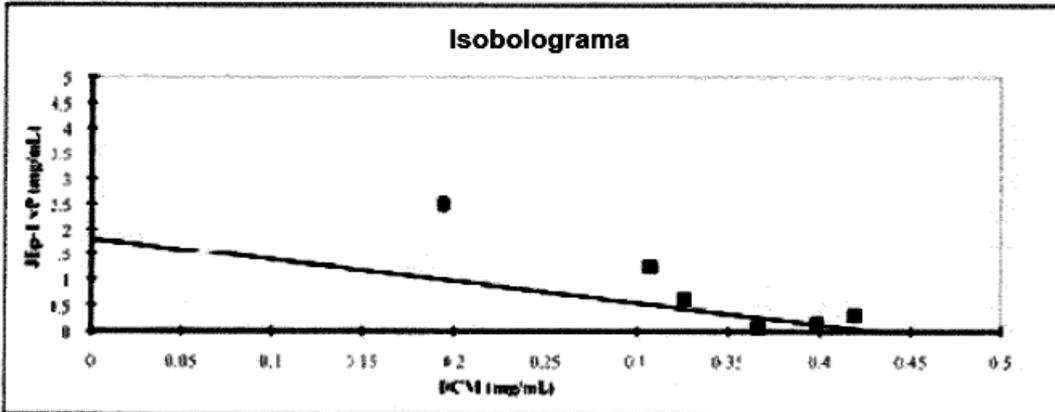


FIGURA 13

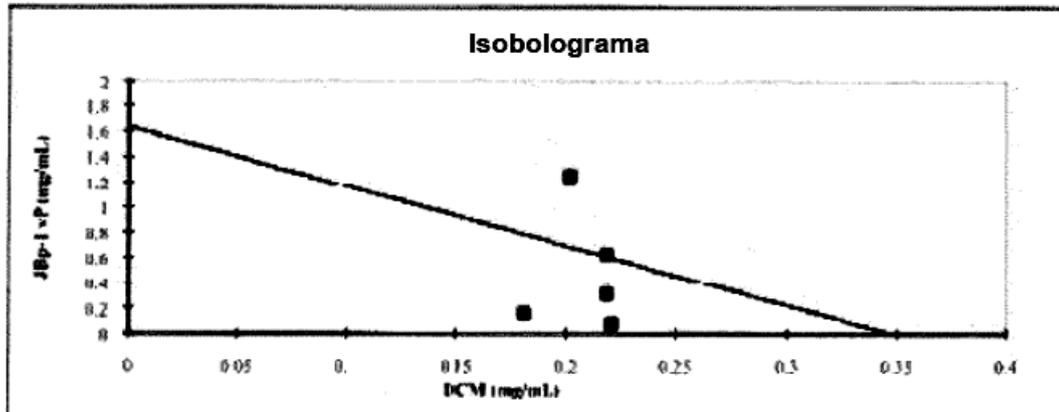
**A-549**



**HCT-15**

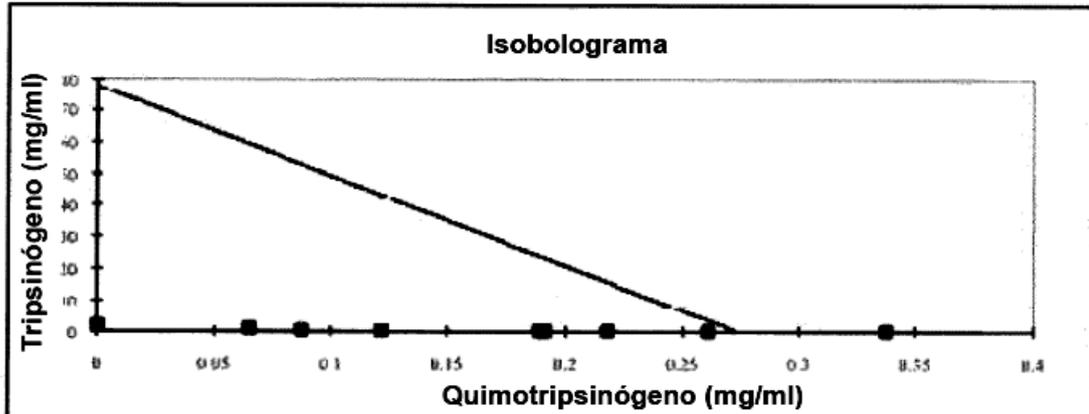


**MIAPaCa-2**

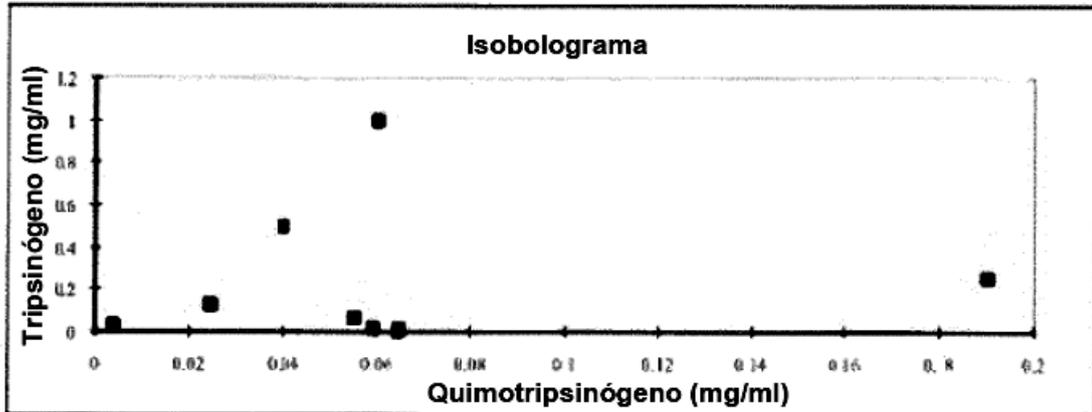


**FIGURA 14**

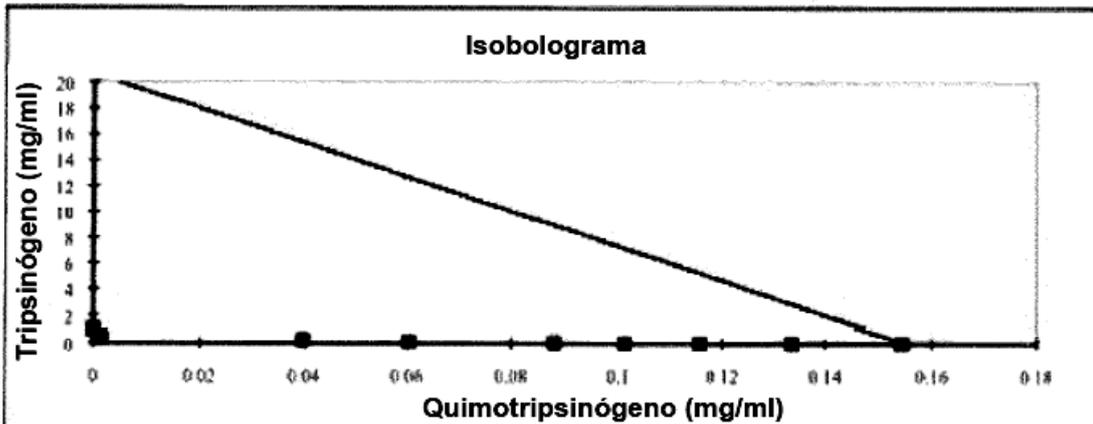
**A-549**



**HCT-15**

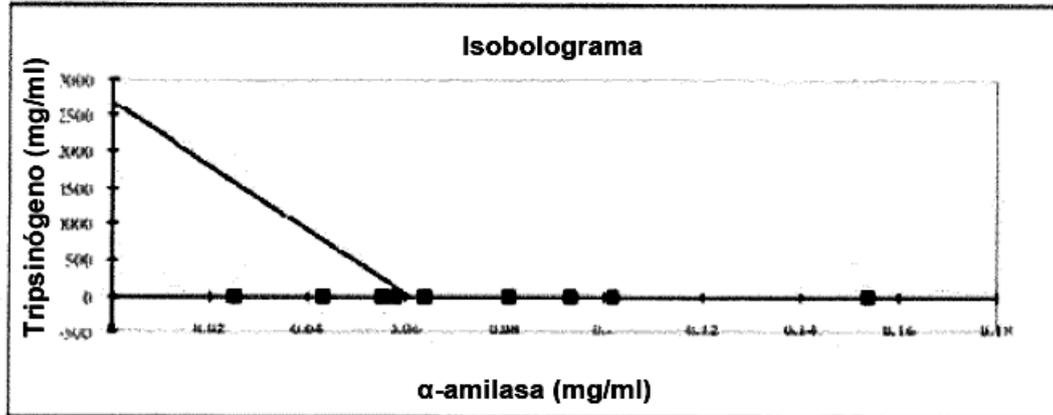


**MIAPaCa-2**

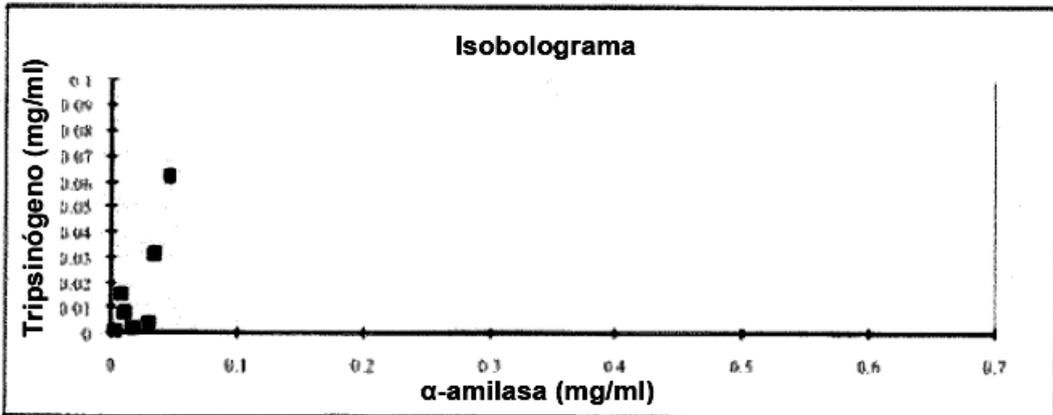


**FIGURA 15**

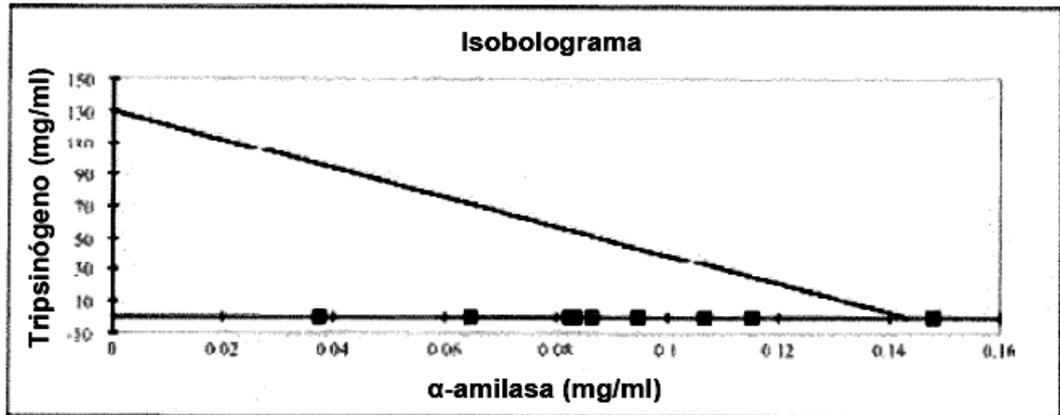
**A-549**



**HCT-15**

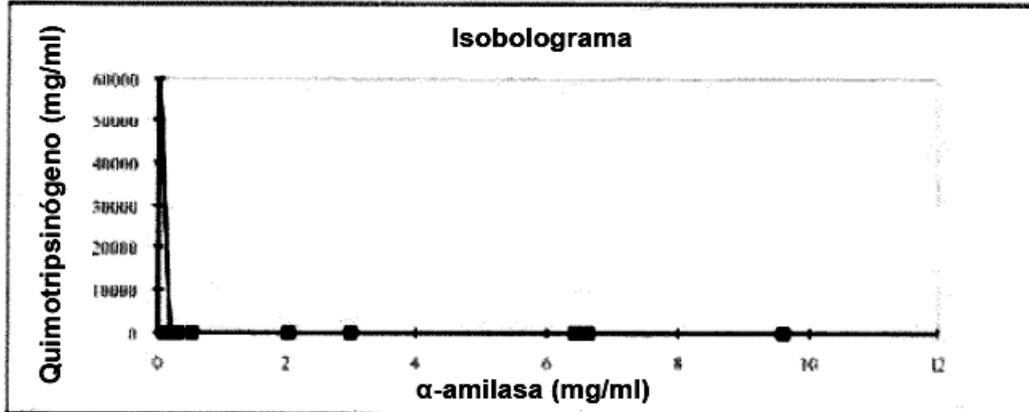


**MIAPaCa-2**

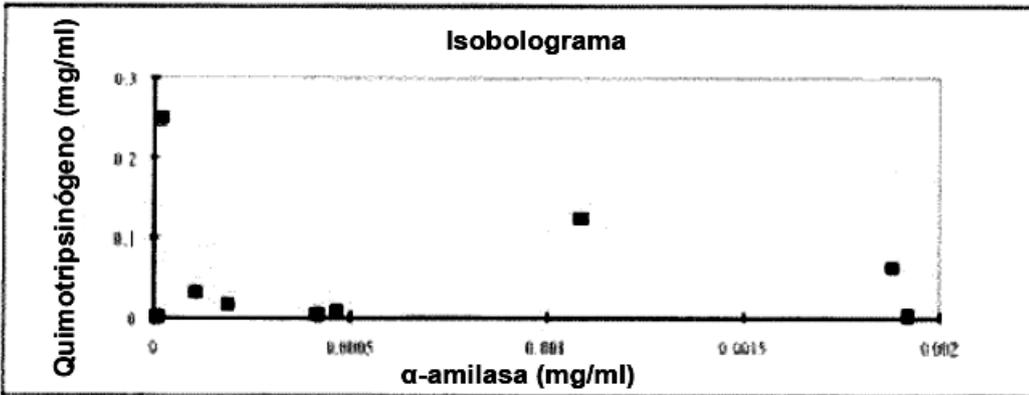


**FIGURA 16**

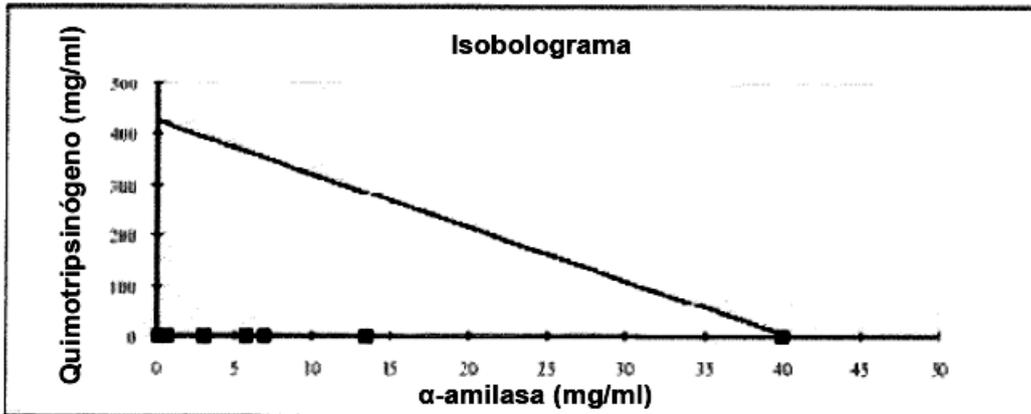
**A-549**



**HCT-15**

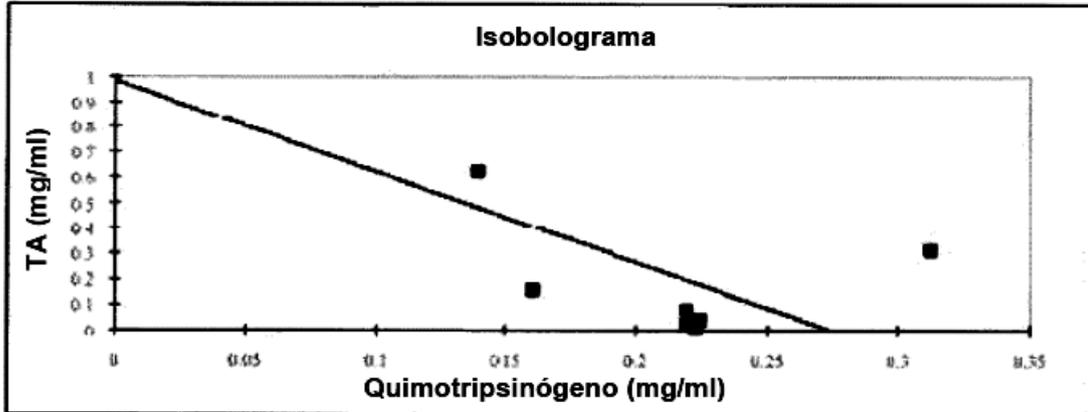


**MIAPaCa-2**

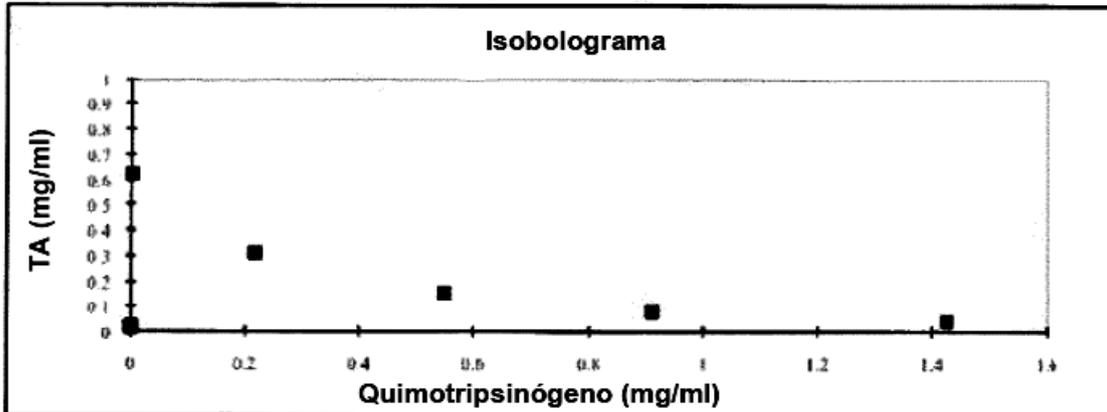


**FIGURA 17**

A-549



HCT-15



MIAPaCa-2

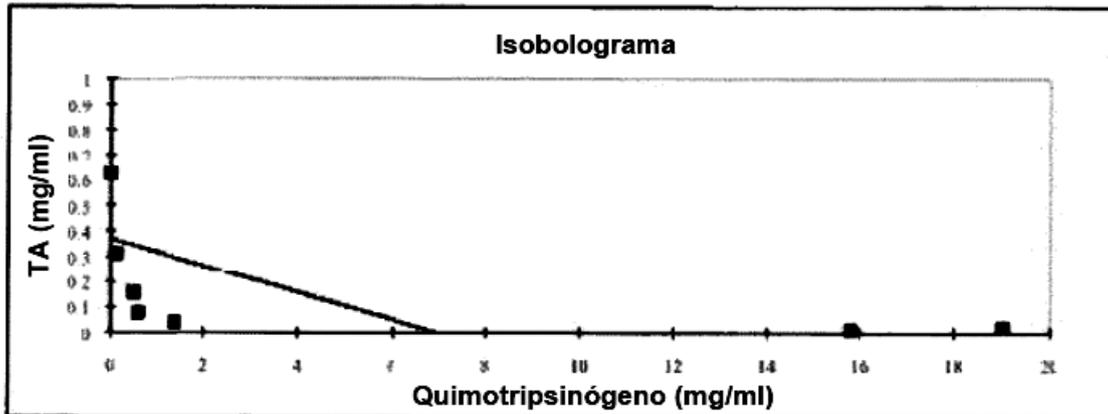
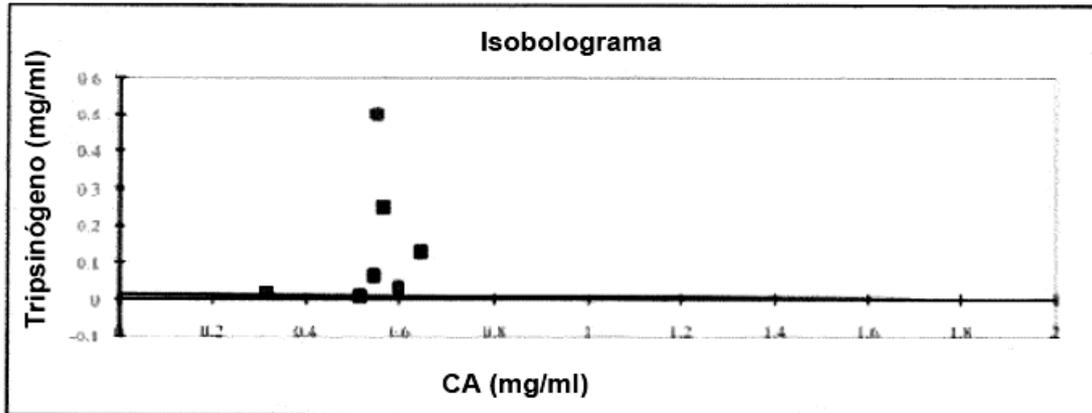
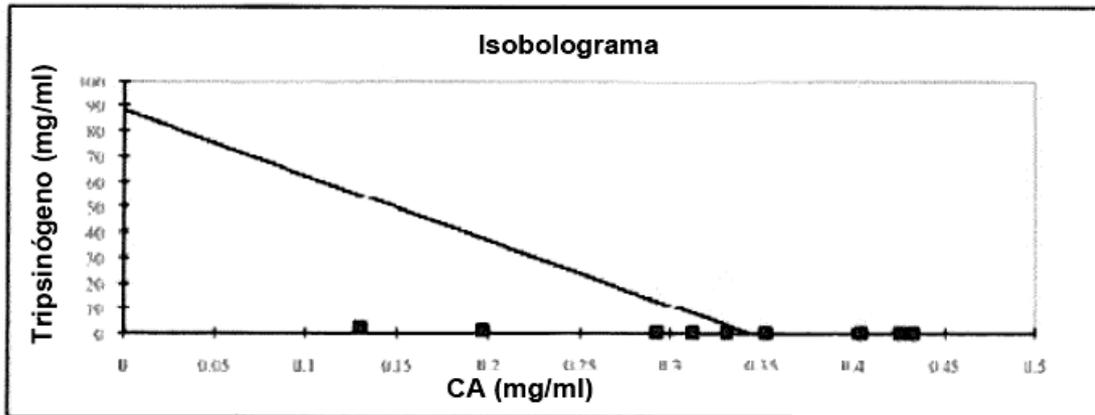


FIGURA 18

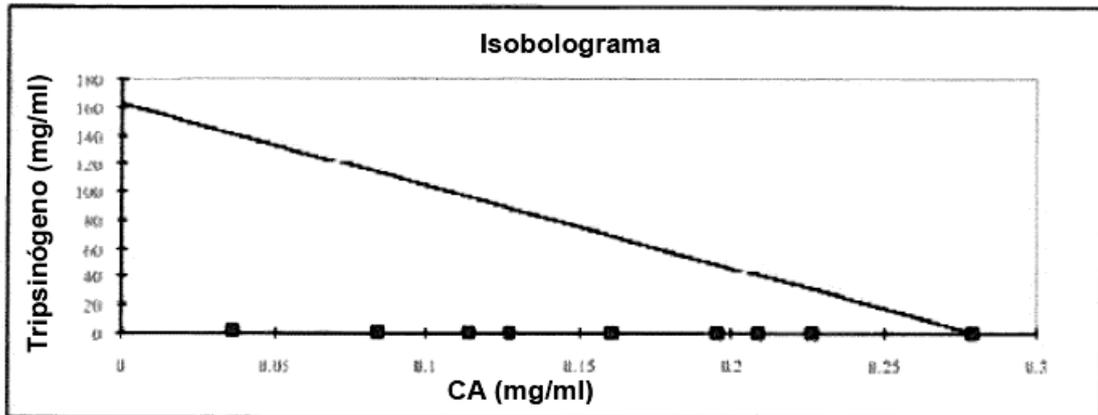
**A-549**



**HCT-15**

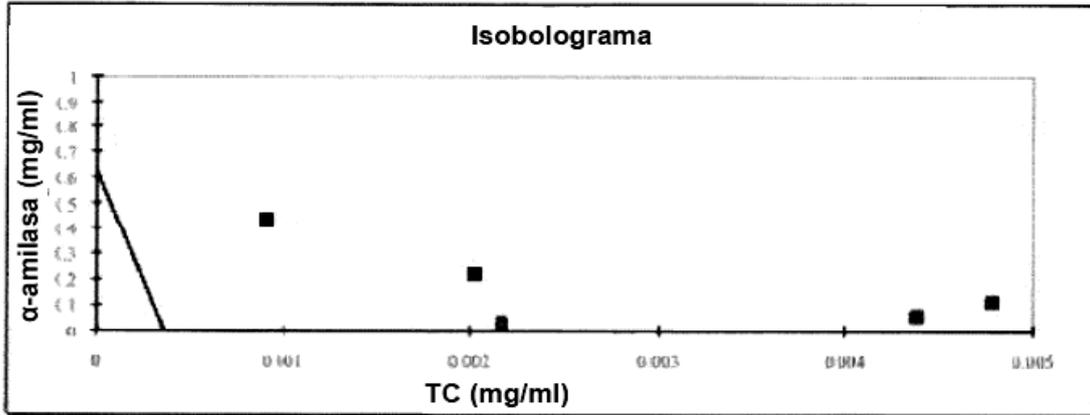


**MIAPaCa-2**

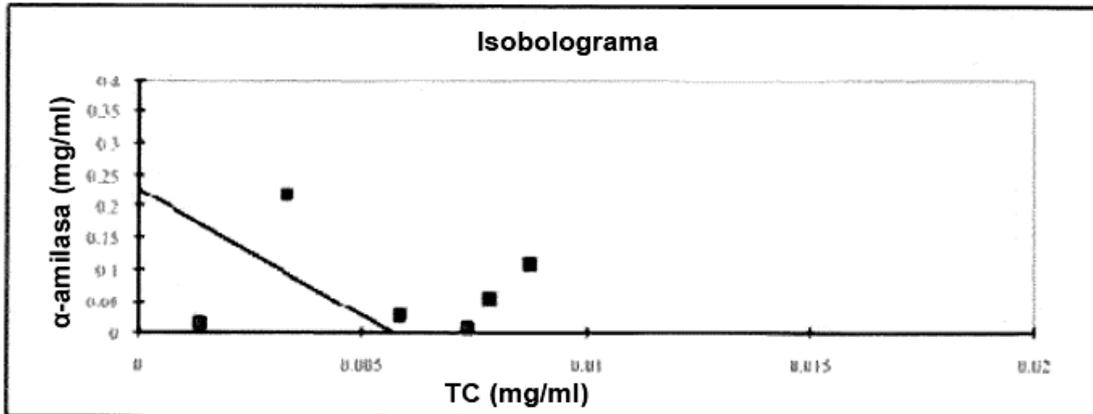


**FIGURA 19**

**A-549**



**HCT-15**



**MIAPaCa-2**

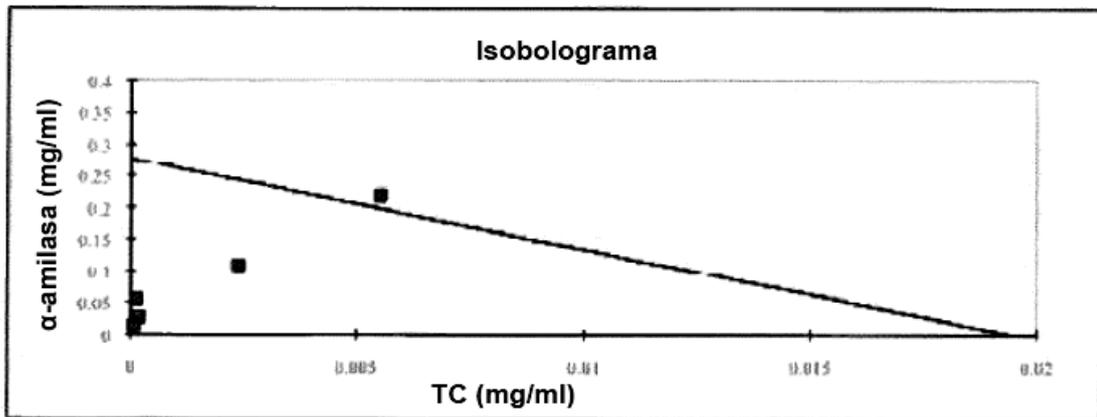


FIGURA 20

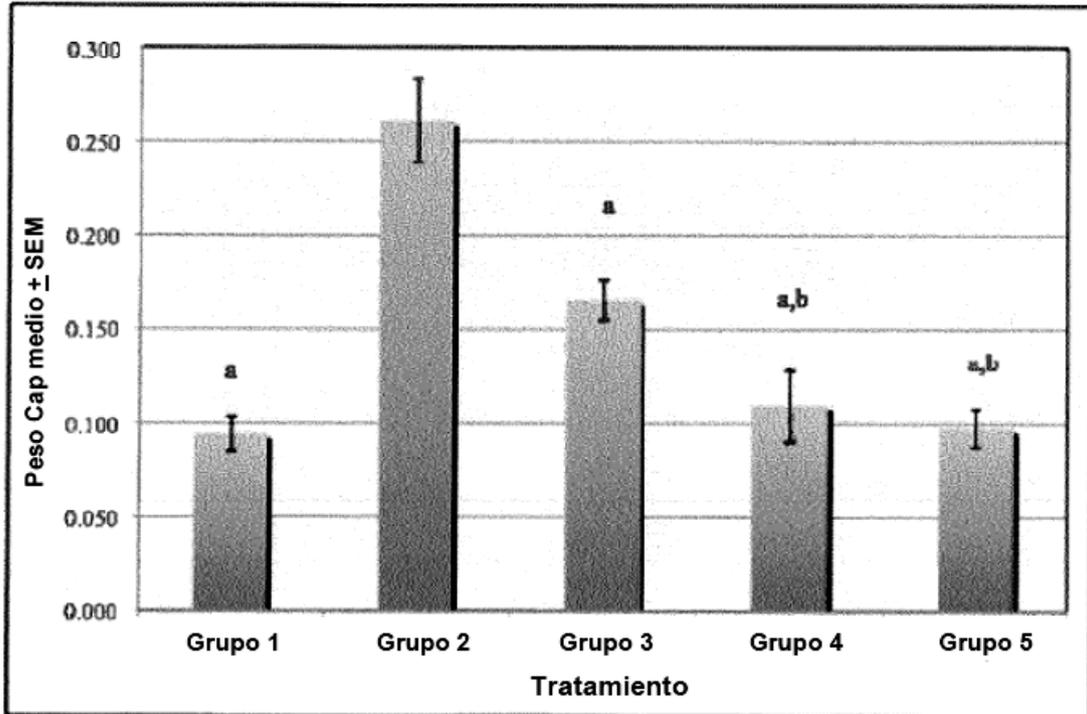


FIGURA 21

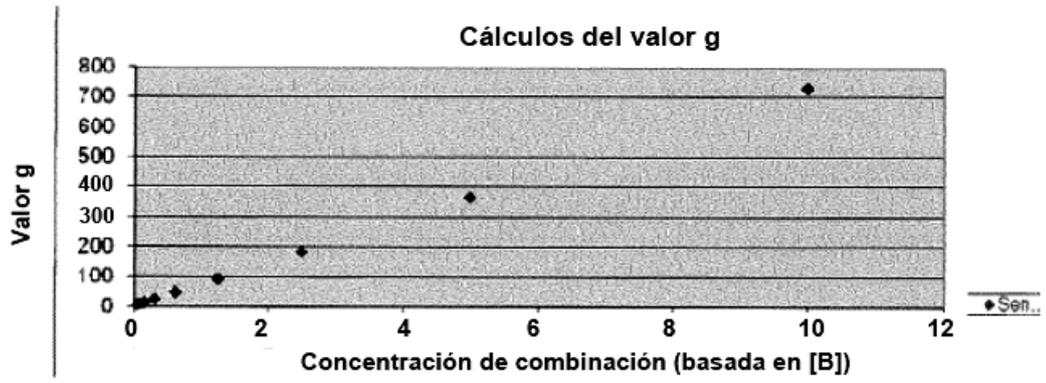


FIGURA 22B

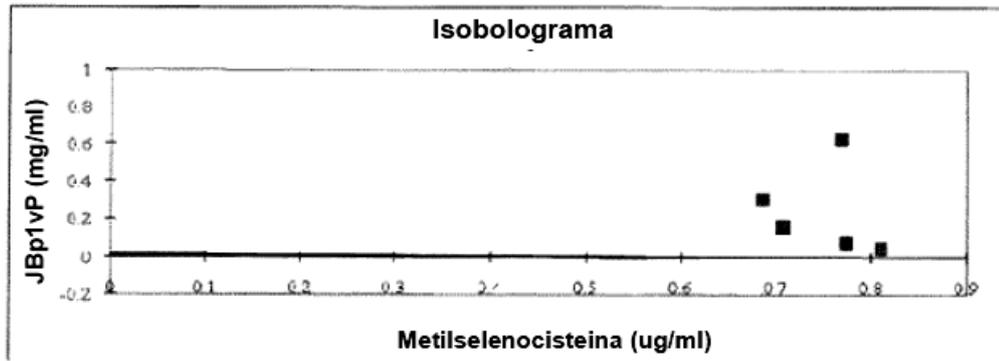


FIGURA 22A

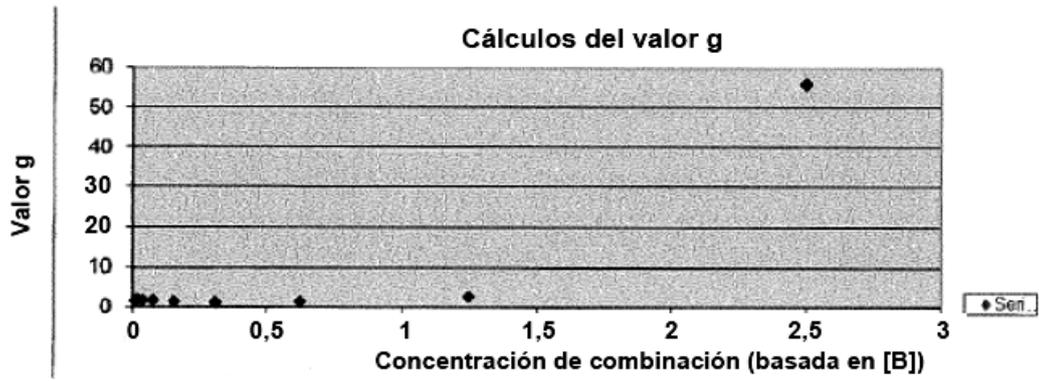


FIGURA 23B

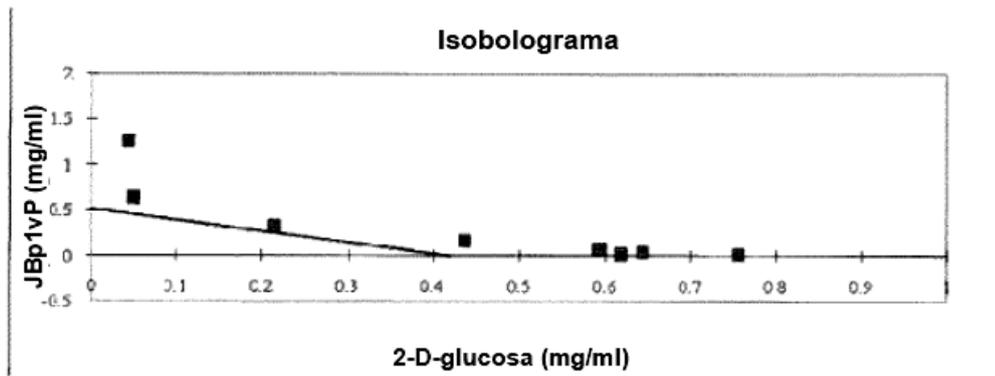


FIGURA 23A

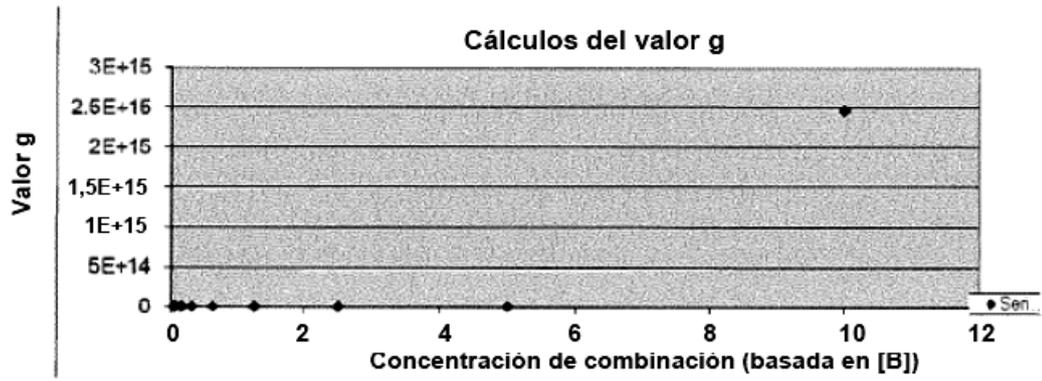


FIGURA 24B

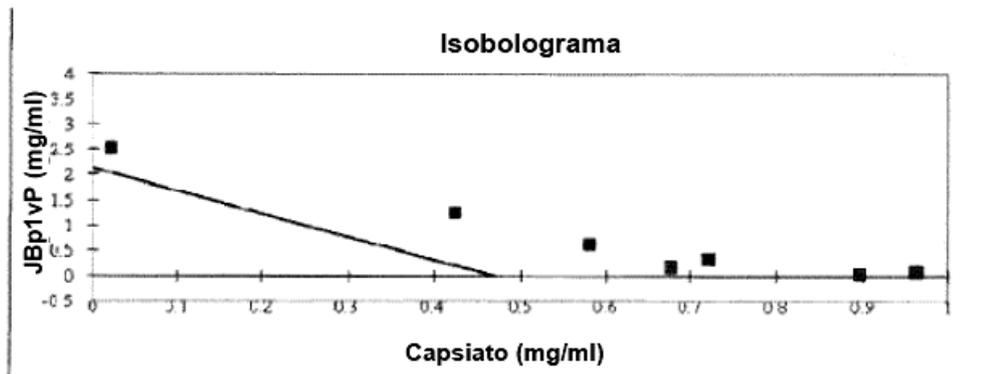


FIGURA 24A

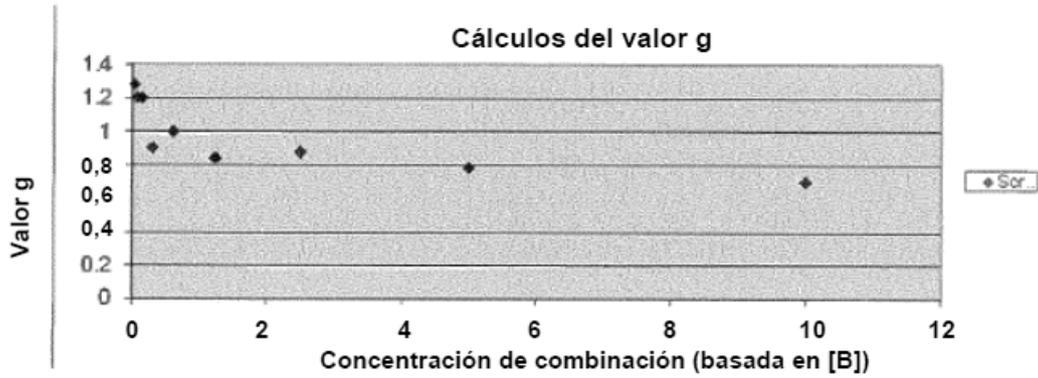


FIGURA 25B

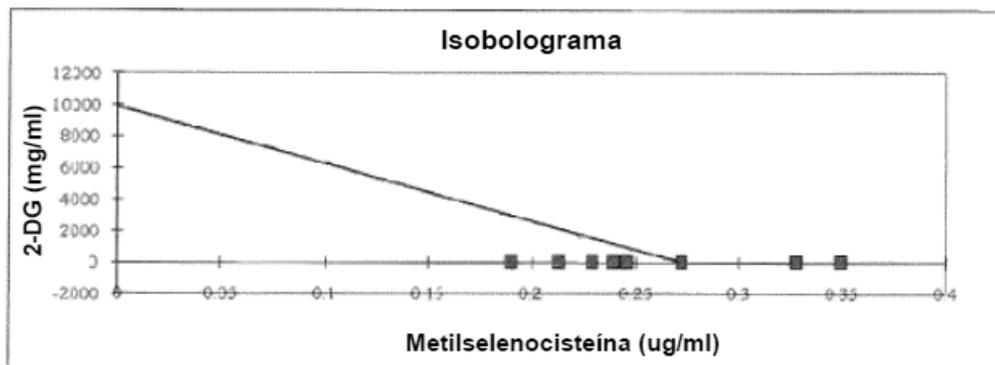


FIGURA 25A