

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 958**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/IB2013/051053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13118093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13711971 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2812017**

54 Título: **Glucoproteína de Tamm-Horsfall (THP) como fármaco inmunoestimulante y composiciones para la utilización en un método de tratamiento para inhibir el desarrollo tumoral**

30 Prioridad:

09.02.2012 US 201261596863 P

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

20.02.2019

73 Titular/es:

INSTITUTO MASSONE S.A. (50.0%)

Arias 4431

C1430CSE Buenos Aires, AR y

MASSONE, RAÚL ENRIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

CASTELLANO, MIGUEL ANGEL;

GROISMAN, JOSÉ F.;

BALANIAN, LILIANA ESTER;

INSERRA, FELIPE;

SOJO, EMILIO y

WOLFENSON BAND, CLAUDIO FERNANDO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 700 958 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

Glucoproteína de Tamm-Horsfall (THP) como fármaco inmunoestimulante y composiciones para la utilización en un método de tratamiento para inhibir el desarrollo tumoral.

5 La presente invención se refiere a la utilización de la THP (glucoproteína de Tamm-Horsfall urinaria humana) (UniProtKB/Swiss-Prot P07911) (THP) para su utilización en la inhibición del desarrollo tumoral utilizando la glucoproteína de Tamm-Horsfall.

10 Se informa de la capacidad para mejorar la resistencia a tumores e infecciones en la presente solicitud.

Se utiliza una proteína urinaria humana altamente purificada, homogénea en electroforesis en gel de poliacrilamida. La identificación de la proteína se realiza por determinación de peso molecular, secuenciación de aminoácidos en la fracción de proteína e inmunoensayo ligado a enzimas.

15 Se obtuvo THP como un subproducto de la producción de hCG o hMG (THP-hCG, THP-hMG).

Los viales utilizados contienen 4,8 mg de proteína liofilizada y 200 mg de lactosa, y Tris base 50 mg.

20 El producto es un polvo blanco, libre de pirógenos. El peso molecular de la proteína es de aproximadamente 90 kDa. También se analizó una forma pegilada de la proteína.

La composición farmacéutica resultante (viales) se administra por vía parenteral.

25 Las utilidades terapéuticas anteriores de THP no se conocen.

Antecedentes de la invención

30 La glucoproteína de Tamm-Horsfall (THP), también conocida como THP, es una glucoproteína que en los seres humanos está codificada por el gen UMOD. Hasta 150 mg/día de THP se pueden excretar en la orina, lo que la convierte en la proteína más abundante en la orina normal.

35 La THP es una glucoproteína anclada a GPI. No se deriva del plasma sanguíneo, sino que se produce en la rama ascendente gruesa del asa de Henle del riñón de los mamíferos. Aunque la molécula monomérica presenta un MW de aproximadamente 90 kDa, está fisiológicamente presente en la orina en agregados grandes de hasta varios millones de Da. Cuando esta proteína se concentra a bajo pH, forma un gel. La proteína de Tamm-Horsfall es una proteína muy abundante en la orina de los mamíferos. Es la matriz de cilindros urinarios derivados de la secreción de células tubulares renales.

40 Las publicaciones de Weichhart, T., Zlabinger, GJ, and Säemann, M D., (The multiple functions of Tamm-Horsfall protein in human health and disease: A Mystery Clears Up, Wien Klin Wochenschr, 117, 316-322, 2005) and Tsai-Hung, W, Song-Chou, H, Chih-Yao, Y, Yi-Fang, L, Chang-Youh, T, Chia-Li, Y (Intact protein core structure is essential for protein binding, mononuclear cell proliferating, and neutrophil phagocytosis-enhancing activities of normal human Urinary Tamm-Horsfall glycoprotein, Intern. Immunopharmacology, 8, 90-99, 2008) demostraron el efecto inmunoestimulante de la proteína de Tamm-Horsfall.

45 La patente US n° 4.977.244 se refiere a procedimientos para producir THP, una glucoproteína que presenta un peso molecular de 85 kilo daltons. Esta glucoproteína, que se aísla de la orina bruta, así como sus derivados de carbohidratos, son útiles como agentes inmunosupresores o agentes antiinflamatorios. La patente US n° 6.110.688 se refiere a un proceso para purificar la glucoproteína TamP-Horsfall o THP, sus productos purificados y el método para establecer la discriminación entre ambos.

50 Las propiedades y relevancia clínica de la proteína de Tamm-Horsfall fueron revisadas por Luca Rampoldi et al. (2011).

Sumario de la invención

55 Se describe una composición farmacéutica para inhibir el desarrollo de tumores, que comprende la glucoproteína de Tamm-Horsfall, natural o pegilada y un excipiente farmacológicamente aceptable.

60 Un objetivo de la presente invención es proporcionar la composición farmacéutica para la utilización en un tratamiento para inhibir el desarrollo de tumores en mamíferos, que comprende administrar por vía parenteral a un mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de proteína de Tamm-Horsfall humana, natural, o pegilado, y un excipiente farmacológicamente aceptable.

65 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar la utilización de la glucoproteína de Tamm-Horsfall, natural

o pegilada, para preparar una composición para inhibir el desarrollo tumoral en los mamíferos.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es un gráfico que representa peso corporal versus día para control, THP-HMG y THP-HCG del ensayo 1.
- La figura 2 representa los tumores diseccionados del ensayo 2.
- 10 La figura 3 representa los tumores diseccionados del ensayo 3.
- La figura 4 es un gráfico que representa peso tumoral versus día para control y THP que representa el peso medio de tumores en grupos 2 y 3 en el ensayo 5.
- 15 La figura 5 corresponde a los gráficos que representan el efecto de la administración de THP sobre los ratones portadores del cáncer de mama 4T1 del informe del efecto antitumoral de THP.
- La figura 6 corresponde a los gráficos que representan el efecto de la administración de THP sobre los índices hematológicos en ratones portadores de cáncer de mama 4T1 del informe del efecto antitumoral de THP.
- 20 La figura 7 corresponde a los gráficos que representan el análisis histológico de tumores 4T1 e hígado de ratones tratados con THP del informe del efecto antitumoral de THP.
- 25 La figura 8 corresponde a los gráficos que representan el efecto de administración de THP sobre los ratones portadores de cáncer de colon CT26 del informe del efecto antitumoral de THP.
- La figura 9 corresponde a los gráficos que representan el efecto de la administración de THP sobre los índices hematológicos en ratones portadores de cáncer de colon CT26 del informe del efecto antitumoral de THP.
- 30 La figura 10 corresponde a los gráficos que representan el análisis histológico de tumores CT26 de los ratones tratados con THP del informe del efecto antitumoral de THP.
- 35 La figura 11 corresponde a los gráficos que representan el efecto de administración de THP sobre los ratones portadores del melanoma B16 melanoma del informe del efecto antitumoral de THP.
- La figura 12 corresponde a los gráficos que representan el efecto de la administración de THP sobre los índices hematológicos en ratones portadores de melanoma B16 del informe del efecto antitumoral de THP.
- 40 La figura 13 corresponde a los gráficos que representan el análisis histológico de tumores B16 de ratones tratados con THP del informe del efecto antitumoral de THP.

Descripción detallada de la invención

- 45 La inmunodeficiencia (o deficiencia inmunitaria) es un estado en el que la capacidad del sistema inmunitario para combatir enfermedades infecciosas está comprometida o totalmente ausente. La inmunodeficiencia también puede disminuir la inmunovigilancia del cáncer. La mayoría de los casos de inmunodeficiencia se adquieren ("secundaria"), pero algunas personas nacen con defectos en su sistema inmunitario o inmunodeficiencia
- 50 primaria. Los pacientes de trasplantes toman medicamentos para suprimir su sistema inmunitario como medida antirrechazo, al igual que algunos pacientes que padecen un sistema inmunitario demasiado activo. Se dice que una persona que tiene una inmunodeficiencia de cualquier tipo está inmunocomprometida. Una persona inmunocomprometida puede ser particularmente vulnerable a infecciones oportunistas, además de las infecciones normales que pueden afectar a todos.
- 55 Los estudios realizados en la presente solicitud demuestran que el tratamiento con THP natural o pegilada aumenta la respuesta inmunitaria innata en los mamíferos y además inhibe el desarrollo de tumores en los mamíferos.
- 60 THP se preparó de acuerdo con el siguiente método:
- Método descrito en el documento "Rapid isolation of Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) from human urine": Franca Serafini-Cessi, Guivanni Bellabarba, Nadia Malagolini and Fabio Dall'Olio, Journal of Immunological methods, 120 (1989) páginas 185-189.
- 65 La THP se aisló de la orina humana (orina del embarazo humano u orina posmenopáusica humana) de acuerdo

con el procedimiento detallado por los autores del artículo mencionado anteriormente.

5 El método se basa en la tendencia de THP a formar un gel en presencia de iones mono- y divalentes y la capacidad del filtro de tierra de diatomeas para retener selectivamente la mayor parte de la glucoproteína (T-H) presente en la orina humana normal y a continuación su desorción del filtro por agua desionizada.

Las endotoxinas se eliminaron de la glucoproteína (T-H) mediante cromatografía de intercambio aniónico usando DEAE-Sepharosa como un gel y el amortiguador Tris/ClH 40 mM, pH 8,5 como fase móvil.

10 La proteína se eluyó de la columna con 2 volúmenes de lecho de Tris/ClH 40 mM a pH 8,5 y, finalmente, la glucoproteína (T-H) eluida se filtró mediante un filtro de 0,22 Millipore para obtener una solución estéril.

La solución se alicuotó en tubos Falcon x 10 ml y se liofilizó.

15 Caracterización fisicoquímica de la solución liofilizada:

Cada vial liofilizado se resuspendió en un volumen apropiado de agua para obtener una solución de 1 mg/ml.

20 El contenido de proteína se realizó mediante dos métodos: Lowry y cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC usando una columna TSK -30 y Tris 50 mM pH 7,5+ EDTA 10 mM + Tween 20 0,025%.

El peso molecular y la pureza de la glucoproteína aislada se determinaron mediante tinción con SDS-PAGE, Coomassie y plata.

25 En resumen, para la separación electroforética se utilizaron los siguientes equipos y productos químicos:

Mezcla de calibración LMW de Pharmacia Code N° 17-0446-01

30 Gradiente de Phastgel 8-25% Código SDS N°17-0542-01

Tiras de amortiguador SDS Phastgel Código N°17-0516-01

35 Amortiguador de muestra para equipo SDS-page (tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 + SDS 2,5% + Mercaptoetanol 5% + Bromfenolblue 0,01%)

Electroforesis: Sistema Phast, Pharmacia

Escáner con software: ImageMaster 1 D, versión 1,10, Sharp JX 325

40 En condiciones reductoras con ditiotreitól, SDS-PAGE de THP produjo una única banda a 95 kilo daltons, lo que sugiere que THP es un péptido único con enlaces disulfuro intracadena.

45 La especificidad se determinó mediante la prueba ELISA THP (MDBiosciences), los resultados obtenidos mostraron que 1 mg de proteína es equivalente a un 1 mg de THP.

Las proteínas endógenas se eliminan rápidamente del cuerpo y no se pueden tomar por vía oral. Para realizar un tratamiento exitoso con una proteína, a menudo se requieren inyecciones frecuentes del fármaco durante un largo período de tiempo.

50 Un método para aumentar la eficiencia de un fármaco peptídico o proteico terapéutico se basa en la modificación química, lograda mediante la modificación química de las moléculas naturales con polietilenglicol (PEG), conocido como PEGilación.

55 La THP pegilada usada en los ensayos mostrados en la presente solicitud se preparó de acuerdo con los siguientes protocolos:

Protocolo 1 (3,5 mol de PEG/mol de THP)

60 Se disolvieron 14,4 mg de THP en 10 ml de agua destilada; se añadió NaCl c.s al 3,4%. La mezcla se agitó y a continuación se mantuvo en reposo durante 2 horas a 2-8°C. La mezcla se centrifugó y el precipitado se recuperó y se lavó una vez con NaCl 3,5%.

El precipitado obtenido se disolvió en 10 ml de agua destilada.

65 Se añadieron 2,88 mg de tresilato de PEG (Sigma-Aldrich), la mezcla se agitó dos horas a temperatura ambiente.

Se añadió NaCl c.s.a 3,5% y a continuación se mantuvo en reposo durante 1 hora.

La mezcla se centrifugó y el precipitado se conservó a -20°C.

5 Protocolo 2 (7 mol de PEG/ mol de THP)

Se disolvieron 3 viales de THP 09022010 (14,4 mg THP) en 7,2 ml de agua destilada.

10 La mezcla obtenida se dializó frente a 6 l de agua desionizada a 4°C, y a continuación se agitó durante 24 horas, con tres cambios del baño.

Al día siguiente, se recuperó el dializado y se determinó el volumen (17,4 ml).

15 Se añadieron 3,76 mg de tresilato de PEG y la mezcla se agitó durante dos horas a temperatura ambiente.

Se añadieron 0,58 M de NaCl y la mezcla se mantuvo en reposo durante dos horas a 2-8°C.

La mezcla se centrifugó y el precipitado se conservó a -20°C.

20 Se prepararon composiciones farmacéuticas de proteína de Tamm-Horsfall humana pegilada para administración parenteral disolviendo el precipitado obtenido por los protocolos 1 y 2 en agua destilada para obtener una solución que contiene 1 mg/ml.

25 Las composiciones farmacéuticas que contienen THP nativo o pegilado descritas en la presente memoria se administraron a mamíferos que sufren o se considera que sufren de tumores. Además, se administró a pacientes infectados críticos con el fin de aumentar su respuesta inmunitaria innata.

30 En las aplicaciones terapéuticas para tratar tumores, las composiciones se administran a un mamífero en una cantidad suficiente para provocar la regresión del tumor, o por lo menos para detener parcialmente el crecimiento del tumor y la metástasis. Una cantidad adecuada para lograr los objetivos mencionados anteriormente se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". La cantidad eficaz para esas aplicaciones dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la THP (actividad específica, etc.), la forma de administrarla, la etapa y gravedad de los tumores, el peso y el estado general de salud del mamífero y el criterio del médico prescriptor.

35 Las administraciones únicas o múltiples de una composición peptídica como una composición de THP se pueden llevar a cabo con un esquema de dosificación determinado por el médico tratante. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de THP suficiente para tratar eficazmente el mamífero. La administración debe comenzar con la primera indicación de proliferación celular no deseable o poco después del diagnóstico, y continuar hasta que los síntomas se han reducido sustancialmente y durante un período posterior. En casos bien establecidos de tumores, se pueden requerir dosis de carga seguidas de dosis de mantenimiento.

45 Las composiciones farmacéuticas para tratamiento terapéutico están destinadas a administración parenteral, tópica, oral o local. Se describen composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de una THP antitumoral disuelta o suspendida en un portador aceptable, preferentemente un portador acuoso. Se puede usar una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua amortiguadora, solución salina 0,4%, glicina 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su utilización tal como están o liofilizadas, la preparación liofilizada se combina con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y de amortiguación, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano oleato de trietanolamina, etc.

55 Otros métodos para preparar composiciones farmacéuticas serán conocidos por o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con mayor detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 19ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990).

60 **Pruebas experimentales**

Se presenta en la presente memoria un cuerpo sustancial de resultados experimentales para mostrar que la THP puede reducir el desarrollo de tumores y enfermedades infecciosas.

65 Los experimentos realizados indican que la administración de THP por vía subcutánea protege a los ratones (cepa CD1) del desarrollo de las células del sarcoma T180 y de la peritonitis letal producida por Salmonella

enteritidis.

Se inyectó THP en dos dosis diferentes, 15 o 30 mg/kg de peso corporal, por vía subcutánea, en dos inyecciones con un intervalo de 48 horas. No se inyectaron dosis adicionales porque la rápida respuesta inmunitaria de los ratones a los antígenos de proteínas humanas podría afectar los resultados.

Ensayo 1

Ensayo de sarcoma ascítico T 180 versus THP

Métodos

Se utilizaron tres grupos de 6 ratones machos adultos (cepa CD1 en todos los casos):

- 1) Grupo de control
- 2) Grupo de THP (orina posmenopáusica).
- 3) Grupo de THP (orina de embarazo).

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:

En el día 1

- a) El peso corporal está registrado en todos los animales. Se inyecta 1 ml de Sarcoma 180 (87×10^6 células/ml) por vía intraperitoneal.
- b) Inyección subcutánea de 1 ml de solución acuosa 1 mg/m L THP-HCG (lote piloto 09062010).
- c) Inyección subcutánea de 1 ml de solución acuosa 1 mg/ml de THP-HMG (lote piloto 09062010).

En el día 3 y el día 4

Se realizó el control del peso corporal.

Resultados

Los resultados se resumen en las siguientes tablas y la figura 1:

Resultados (gramos de peso corporal).

Día	Control			THP-HMG			THP-hCG		
	1	3	4	1	3	4	1	3	4
	09/28/2011	09/29/2011	09/30/2011	09/27/2011	09/29/2011	09/29/2011	09/27/2011	09/29/2011	09/30/2011
	24.1	25.8	32.6	30.8	32.1	30.3	25.8	26.0	26.6
	26.8	26.2	29.3	24.0	23.1	24.1	25.9	27.0	32.0
	32.9	35.4	36.6	29.4	29.7	34.3	30.0	33.8	27.6
	27.0	29.4	37.6	27.0	29.0	26.4	29.8	32.2	29.4
	32.2	34.7	36.5	26.5	29.7	31.5	27.6	29.5	28.6
	27.2	34.2	27.7	24.5	26.2	28.1	27.0	27.3	31.9
PROM.	28.4	31.0	33.4	27.0	28.3	29.1	27.7	29.3	29.4

Día	Control	THP-HMG	THP-HCG
1	28.4	27.0	27.7
3	31.0	28.3	29.3
4	33.4	29.1	29.4

Prueba t de Student en el día 4

Control	THP-HMG
---------	---------

Control	THP-HMG
32,6	30,3
29,3	24,1
36,6	34,3
37,6	26,4
36,5	31,5
27,7	28,1

Prueba t de dos muestras asumiendo varianzas desiguales

	Variable 1	Variable 2
Media	33,3833333	29,35
Varianza	17,4856667	4,943
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de media	0	
Grados de libertad	8	
T estadística	2,08611388	
P(T<=t) una cola	0,03522122	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954803	
P(T<=t) dos colas	0,07044244	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600413	

5 La figura 1 presenta el aumento de los pesos corporales correspondientes al grupo de control 1) con respecto a los grupos 2) y 3) tratados respectivamente con THP-HCG y THP-HMG.

Conclusión del ensayo 1:

10 Como se puede apreciar, los valores de peso corporal observados en los grupos 2) y 3) que se trataron con THP, mostraron una disminución en comparación con el grupo de control 1); en consecuencia, se considera que los animales de los grupos 2) y 3) sufrieron una disminución en los pesos corporales que se puede asociar con la inhibición del desarrollo tumoral realizada por THP.

15 **Ensayo 2**

Para confirmar la conclusión obtenida en el ensayo 1, el ensayo 2 se realizó de la siguiente manera:

20 SARCOMA-180 sólido versus THP

Métodos:

Se usaron dos grupos de 6 ratones machos adultos cada uno:

25 El grupo 01 comprende un grupo de sarcoma, en el que el sarcoma 180 se inyectó por vía subcutánea en seis animales.

30 El grupo 02 comprende el grupo sarcoma más THP, en el que seis animales son inyectados por vía subcutánea con sarcoma 180 y son inyectados con THP-HMG.

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:

En el día 1

- 35 a) Los ratones se distribuyeron aleatoriamente entre los grupos.
- b) Se inyectaron por vía subcutánea 0,5 ml de suspensión de células Sarcoma 180 (19×10^6 células/ml) en el costado derecho de los animales.
- 40 c) Se inyecta 1 mg de THP-HMG en el grupo 02: 1 ml de THP-HMG (lote piloto 09062010) por vía subcutánea.

En el día 3

45 El grupo 02 recibe una nueva dosis de THP-HMG, 1 mg s.c. por animal

ES 2 700 958 T3

En el día 5

Todos los animales se pesan y sacrifican. Los tumores se diseccionan y se pesan.

5 Resultados

Los resultados se resumen en las siguientes tablas y figura 2 correspondientes a los tumores diseccionados:

Resultados

10

l) Tabla de peso

Peso corporal	
Sarcoma (g)	Sarcoma-THP (g)
35,7	32,8
32,5	34,8
35,2	31,3
35,5	33,8
35,6	32,3
34,8	29,0
Prom.	34,9
	32,3

15

Prueba T para dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	34,88333333	32,33333333
Varianza	1,46966667	4,12666667
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	-0,37898992	
Diferencia hipotética de media	0	
Grados de libertad	5	
T estadística	2,283643619	
P(T<=t) una cola	0,03548236	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504837	
P(T<=t) dos colas	0,07096471	
Valor crítico de t (dos colas)	2,57058483	

Peso del tumor	
Sarcoma (g)	Sarcoma-THP (g)
197,5	106,8
401,0	108,5
363,7	160,3
296,3	288,9
216,0	106,9
509,4	408,8
Prom.	330,7
	196,7

Prueba T para dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	330,65	196,65
Varianza	14009,291	12751,883
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0,66770199	
Diferencia hipotética de media	0	
Grados de libertad	5	
T estadística	3,29491506	
P(T<=t) una cola	0,01079808	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504837	
P(T<=t) dos colas	0,02159616	
Valor crítico de t (dos colas)	2,57058183	

20

La figura 2 muestra el peso de los tumores diseccionados en los que el tamaño de los tumores de los animales del grupo 01 (Sarcoma) resulta considerablemente mayor que el grupo 02 (Sarcoma-THP).

Conclusión del ensayo 2:

5 Como se puede apreciar, el peso de los tumores observados en el grupo 02, que se trató con THP, es más pequeño que los del grupo 01; en consecuencia, se considera que en el grupo 02, la administración de THP inhibió el desarrollo y crecimiento del tumor.

10 El ensayo 2 confirma que la disminución en los pesos corporales observada en el ensayo 1 se debe a una inhibición del desarrollo tumoral en la que el peso de los tumores resulta menor cuando se aplica THP en comparación con un grupo de control.

Ensayo 3

15 Para evaluar si la administración de una proteína extraña podría inhibir *per se* el desarrollo de tumores en ratones, se realizó el ensayo 3:

Sarcoma-180 versus THP y gamma globulina humana

Métodos:

20 Se usaron dos grupos con 6 ratones macho adultos albinos:

Grupo 1 correspondiente al grupo de sarcoma - hGamma globulina (grupo de control)

25 Grupo 2 correspondiente al grupo de sarcoma - THP

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:

En el día 1

- 30 a) Se inyectan 0,5 ml de suspensión de células de sarcoma-180 (40×10^6 células/ml) en ambos grupos por vía subcutánea.
- 35 b) Se inyecta 1 mg de gamma globulina humana en animales del grupo 1: 1 ml de solución salina con 1 mg/ml de gamma globulina humana (Globulina-A 5000 mg) s.c.
- 40 c) 1 mg de THP-HMG se inyecta al grupo 2: 1 ml de solución acuosa que contiene 1 mg/ml de THP-HMG. (Lote piloto 09062010).

40 En el día 3

Una nueva dosis de THP-HMG y hGAMMA se inyecta a cada grupo (ídem día 1).

45 En el día 5

Todos los animales se pesan y sacrifican. Los tumores se diseccionan y se pesan.

Resultados

50 Los resultados se resumen en las siguientes tablas y la figura 3 corresponde a los tumores diseccionados:

Resultados

55 III) Tabla de peso

Peso corporal	
Sarcoma-hGamma (g)	Sarcoma-THP (g)
30,7	28,7
30,5	27,6
33,5	27,9
27,2	25,0
33,8	31,9
26,2	28,2
Prom. 30,3	28,2

Prueba T para dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	30,31666667	28,21666667
Varianza	9,821666667	4,925666667
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0,632262178	
Diferencia hipotética de media	0	
Grados de libertad	5	
T estadística	2,108450738	
P(T<=t) una cola	0,044398089	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048372	
P(T<=t) dos colas	0,088796178	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581835	

Peso del tumor	
Sarcoma-hGamma (mg)	Sarcoma-THP (m)
277,4	76,9
334,0	103,3
159,1	214,2
345,7	201,0
602,2	203,2
434,6	86,4
Prom.	358,8 147,5

5 Prueba T para dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	358,8333333	147,5
Varianza	22456,37867	4216,968
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0,035928672	
Diferencia hipotética de media	0	
Grados de libertad	5	
T estadística	3,211985079	
P(T<=t) una cola	0,011838127	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048372	
P(T<=t) dos colas	0,023676253	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581835	

Conclusión del ensayo 3:

10 Como se puede apreciar, la administración de una proteína extraña como gamma globulina humana no inhibe el desarrollo y crecimiento del tumor como se puede apreciar en los resultados de peso corporal y tumor, en comparación con los mismos valores obtenidos del grupo en el que se aplicó THP.

Ensayo 4

15 Para evaluar la eficacia en la inhibición del crecimiento tumoral de un derivado de THP, como THP pegilado, se realizó el ensayo 4

Actividad antitumoral de THP pegilada

20 Método

Se usaron dos grupos con 6 ratones machos adultos cada uno:

25 Grupo 1 correspondiente al grupo de sarcoma.

Grupo 2 correspondiente al grupo de sarcoma-THP-PEG.

El ensayo se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:

30

ES 2 700 958 T3

En el día 1

- a) Se inyectaron 0,5 ml de suspensión de células sarcoma-180 (30×10^6 células/ml) en ambos grupos en el costado derecho de los animales.
- b) 1 mg de THP-PEG disuelto en 1 ml de solución acuosa se inyecta en el costado izquierdo de cada animal del grupo 2.

Día 3

Se registró el peso de los animales.

El grupo 2 recibe una segunda dosis (ídem al día 1 b) de THP-HMG-PEG: inyección subcutánea de 1 ml de una solución acuosa que contiene 1 mg/ml de THP-HMG-PEG en el costado izquierdo del animal.

Día 6

Todos los animales se pesan y sacrifican, los tumores se diseccionan y se pesan.

Resultados

Los resultados se resumen en las siguientes tablas:

Resultados:

V) Tabla de peso

Peso corporal en el día 6 (g)	
Sarcoma (Control)	Sarcoma-THP-PEG
33,1	30,6
29,6	29,6
28,3	28,3
32,6	32,6
31,4	31,4
28,2	28,2
Prom.	30,5

Peso del tumor (mg)	
Sarcoma (control)	Sarcoma-THP-PEG
307,3	59,4
104,0	44,9
276,6	154,1
158,4	87,2
118,9	67,9
107,9	89,7
Prom.	178,85

Prueba T de Student para muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	178,85	83,86666667
Varianza	8140,619	1469,967667
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0,411325076	
Diferencia hipotética de media	0	
Grados de libertad	5	
T estadística	2,828750208	
P(T<=t) una cola	0,018364323	
Valor crítico de t (una cola)	2,015048372	
P(T<=t) dos colas	0,036728645	
Valor crítico de t (dos colas)	2,570581835	

Conclusión del ensayo 4:

5 Como se puede apreciar, los pesos tumorales obtenidos en el día 6 fueron considerablemente más bajos para el grupo de animales tratados con THP-PEG en comparación con el grupo de animales no tratados, lo que demuestra que THP-PEG produce una inhibición del desarrollo y crecimiento de tumores así como la THP natural.

Ensayo 5

10 El objetivo de este ensayo consiste en evaluar la eficacia del tratamiento con THP en tumores desarrollados previamente.

Actividad antitumoral de THP de THP en tumores desarrollados previamente.

15 Métodos:

Se usaron tres grupos de 6 ratones machos adultos:

20 Grupo 1 sarcoma (desarrollo de tumor día 3)

Grupo 2 sarcoma (grupo control)

Grupo 3 sarcoma THP

25 El ensayo se realizó según el siguiente esquema:

En el día 1

30 a) Se inyectaron 0,5 ml de suspensión de células de sarcoma 180 (28×10^6 células/ml) en el costado derecho de cada animal, por vía subcutánea.

En el día 3

35 b) Grupo 1, los ratones se sacrifican, los tumores se diseccionan y se pesan para establecer el grado de desarrollo de los tumores en esta etapa.

Se inyecta 1 mg de THP-HMG se inyecta un Grupo 2: 1 ml de solución acuosa que contiene 1 mg/ml de THP en el costado izquierdo de cada animal, por vía subcutánea.

40 En el día 5

Se administra 1 mg de THP-HMG al Grupo 2 (día 3).

45 En el día 7

Los ratones se pesan, se sacrifican y los tumores se diseccionan y se pesan.

Resultados

50 Los resultados se resumen en las siguientes tablas y la figura 4, corresponde al peso medio de los tumores en los grupos 2 y 3:

Resultados

55 I) Tabla de peso del tumor

Peso del tumor (mg)		
Grupo 1 día 4 sarcoma	Grupo 2 día 7 sarcoma-THP	Grupo 3 día 7 sarcoma
29,4	60,9	182,9
48,7	53,7	209,1
30,0	47,4	215,8
18,1	54,6	105,3
33,1	38,3	128,9

Peso del tumor (mg)			
	Grupo 1 día 4 sarcoma	Grupo 2 día 7 sarcoma-THP	Grupo 3 día 7 sarcoma
	34,4	8,6	110,6
Prom	32,3	43,9	158,8

Estadística:

Prueba t de Student. Grupo 1 versus Grupo 2: p 0,26.

5

Prueba t de Student. Grupo 2 versus Grupo 3: p 0,0019.

II) Peso corporal el día 7

Peso corporal (Día 7)		
	Grupo 2 sarcoma-THP	Grupo 3 sarcoma
	33,5	32,1
	34,9	34,6
	34,4	40,0
	38,5	32,1
	34,1	37,9
	39,0	38,9
Prom	35,7	35,9

10

La figura 4 representa el peso medio de los tumores en los grupos 2 y 3.

En el gráfico se puede apreciar que en el día 7, el peso promedio de los tumores en los animales en los que se inyectó THP fue considerablemente menor que el peso de los tumores de animales que no fueron tratados con THP (grupo control).

15

Conclusión del ensayo 5:

Como se puede apreciar, el tratamiento con THP en ratones que habían desarrollado tumores previamente inhibió el desarrollo y crecimiento de tumores en comparación con los animales no tratados.

20

Ensayo 6

Este ensayo mostró una acción de protección contra las infecciones obtenida del tratamiento con THP

25

Protección antiinfecciosa mediante THP.

Método

Se usa peritonitis letal en ratones inoculados con *Salmonella enteritidis* más hemoglobina ovina como provocación.

30

El ensayo se realizó según el siguiente esquema:

En el día 1: THP 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg y 5 mg se inyectan por vía subcutánea a grupos de ratones machos adultos.

35

Un control de grupo se inyecta con excipiente.

En el día 2: Todos los animales recibieron por vía intraperitoneal 1 ml de una suspensión de *Salmonella enteritidis* (caldo de 24 horas) mezclada con un volumen igual de 10 g/100 ml de solución de hemoglobina ovina.

40

La mortalidad causada por la peritonitis en ratones se observa en la siguiente tabla:

Mortalidad por peritonitis en ratones

45

Tiempo de observación: 10 horas después de la inoculación de *S. enteritidis*.

Tratamiento	Vivos	Muertes	Porcentaje de animales muertos
Control	1	6	86
THP 0,1 mg	0	5	100
THP 0,5 mg	1	4	80
THP 1 mg	5	0	0
THP 1 mg	5	0	0

Prueba exacta de Fisher

5

Peritonitis por <i>S. Enteritidis</i> en ratones			
	vivos	muertes	total
control	1	6	7
THP	5	0	5
total	6	6	12

probabilidad 0,0000015

Conclusión del ensayo 6:

10

Como se puede apreciar, el tratamiento con THP en dosis superiores a 1 mg disminuye la mortalidad por peritonitis cuando se inocula *Salmonella enteritidis* en ratones. La THP aumenta las barreras de defensa en ratones contra *Salmonella enteritidis*.

15 Informe de efecto antitumoral de THP

Para confirmar las conclusiones del ensayo 1-6, especialmente los resultados del ensayo 5 (eficacia de THP en tumores previamente desarrollados) y evaluar la acción antitumoral de THP contra diferentes estirpes celulares de tumores en diferentes especies de ratones, se realizaron estudios *in vivo* considerando las siguientes referencias de documento:

20

1. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences National Research Council. 1996. DC: National Academy Press.

25

2. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. BMC Cancer 2008; 8:228.

30

3. Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. Cancer Res 1980; 40:2142-46.

35

4. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. Science 1977; 197:893-95.

5. Leng HM, Albrecht CF, Kidson SH, Folb PI. Erythropoietin production in anemia associated with experimental cancer. Exp Hematol 1999; 27:806-10.

Los ensayos se realizaron de la siguiente manera:

40

Materiales y métodos

Reactivos: se usó proteína Tam m-Horsfall humana (THP, lote: 26062012; 0,9 mg/ml) disuelta en TRIS 40 mM pH = 8. Las diluciones se realizaron en agua apirógena estéril.

45

Cultivo celular: Se obtuvieron células tumorales mamarias de ratón 4T1, estirpes celulares de carcinoma de colon CT26 de ratón y melanoma B16 de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). 4T1 y CT26 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) y se suplementaron con glutamina 2 mM y suero de carnero fetal 10% (FCS, Gen, Buenos Aires, Argentina). Las células B16 se cultivaron en medio RPMI 1640 rico en glucosa y se suplementaron con aminoácidos no esenciales, glutamina 2 mM y FCS 10%. Todos los tipos de células se cultivaron a 37°C en una incubadora humidificada que contiene CO₂ 5%.

50

Estudios *in vivo*: los experimentos se realizaron en ratones BALB/c hembra vírgenes (8-9 semanas de edad), criados en el Instituto de Biología y Medicina Experimental de Buenos Aires (para experimentos de estirpes celulares 4T1 y CT26) o en ratones C57BL hembra virgen (8-9 semanas de edad) obtenidos de la Universidad

Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina, para experimentos B16), y en condiciones libres de patógenos usando campanas de filtro HEPA. Los ratones se alojaron en grupo en condiciones de fotoperíodo constante (12 horas de luz: 12 horas de oscuridad) con acceso *ad libitum* a alimentos y agua en grupos de 4-5 en jaulas de plástico ventiladas con cubiertas de filtro de fibra de poliéster. Cada animal fue asignado y seguido individualmente a lo largo de los experimentos. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con los estándares más altos de cuidado de animales según lo descrito por National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1).

Cada ratón se inoculó por vía subcutánea (s.c.) en el costado derecho con 1×10^5 , 3×10^5 , $2,5 \times 10^5$ para las estirpes celulares 4T1, CT26 y B16 respectivamente en un volumen total de 0,1 ml de medio sin suero. A medida que los tumores se establecieron (volumen de tumor promedio inicial, $\sim 100 \text{ mm}^3$), los ratones se aleatorizaron a diferentes grupos (día 1) y se inyectaron s.c. en el costado izquierdo con 150 microlitros de diferentes dosis de THP. Los ratones recibieron tres dosis en total, una cada dos días a partir del día 1. El día 7, se sacrificaron los ratones.

Células 4T1.

Los ratones se aleatorizaron en cinco grupos ($n = 10$) que recibieron los siguientes tratamientos: (a) control (TRIS 4 mM pH = 8) (b) 187 microgramos/kg de peso corporal/dosis, (c) 375 microgramos/kg de peso corporal/dosis, (d) 750 microgramos/kg de peso corporal/dosis y (e) 1500 microgramos/kg de peso corporal/dosis.

Células CT26.

Los ratones se aleatorizaron en cuatro grupos que recibieron los siguientes tratamientos: (a) control (TRIS 4 mM pH = 8), $n = 5$ (b) 375 microgramos/kg de peso corporal/dosis, $n = 4$ (c) 750 microgramos/kg de peso corporal/dosis, $n = 4$ y (d) 1500 microgramos/kg de peso corporal/dosis, $n = 4$.

Células B16.

Los ratones se aleatorizaron en cuatro grupos ($n=8$) que recibieron los siguientes tratamientos: (a) control (TRIS 4 mM pH=8) (b) 375 microgramos/kg de peso corporal/dosis, (c) 750 microgramos/kg de peso corporal/dosis y (d) 1500 microgramos/kg de peso corporal/dosis.

En todos los experimentos, los tumores se midieron tres veces a la semana con un calibrador digital y sus volúmenes se calcularon con una fórmula estándar: $(\text{ancho}^2 \times \text{largo})/2$. Las tasas de crecimiento del tumor se determinaron como las pendientes de las curvas de crecimiento estimadas por la medición del volumen. Los pesos corporales se midieron semanalmente. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se calculó dividiendo el volumen tumoral medio o el peso del grupo tratado con THP por el volumen tumoral medio o el peso de los controles del grupo, a continuación se resta el valor resultante de 1 y se multiplica por 100. En el sacrificio terminal, se extirparon el hígado, bazo, pulmones y riñones y se recogieron y pesaron los tumores. El bazo también se pesó. Todos los órganos y tejidos de los tumores se fijaron durante la noche en formalina 10% y a continuación se transfirieron a etanol 70%. Las secciones de tejido incluidas en parafina de cuatro micrómetros de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina mediante procedimientos estándares. La sangre de cada ratón se evaluó a partir de los parámetros hematológicos utilizando un contador Coulter.

Análisis estadístico: para la comparación de pesos relativos de tumores entre múltiples grupos de animales, se realizó un ANOVA ordinario seguido de un análisis de comparación múltiple post ANOVA de Tukey-Kramer. Los valores de probabilidad (P) inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Para examinar la eficacia antitumoral *in vivo* de THP, se utilizaron diferentes modelos de tumores.

Células 4T1:

Primero, se estudia el efecto de THP en el crecimiento del cáncer de mama 4T1 (2). Los ratones BALB/c portadores de un tumor 4T1 subcutáneo establecido (volumen tumoral medio, $128,6 \pm 7,9 \text{ mm}^3$) se trataron s.c. durante 7 días con THP a 187, 375, 750 o 1500 microgramos/kg cada dos días o con vehículo. Como se muestra en la figura 5A, el tratamiento de ratones con 187 y 1500 mg/kg de THP inhibió significativamente el crecimiento del tumor 4T1 en un 38% y 40%, respectivamente (tabla 1) el día 7, en relación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$ y $P < 0,01$ respectivamente). Las tasas de crecimiento tumoral, determinadas como las pendientes de las curvas de crecimiento obtenidas durante el tratamiento con THP o vehículo, fueron menores en todos los grupos tratados con THP, en comparación con los animales tratados con vehículo (tabla 1). Es importante destacar que los ratones parecían tolerar el tratamiento con THP sin signos evidentes de toxicidad, sin una variación significativa del peso corporal en comparación con los controles tratados con vehículo (figura 5B). La esplenomegalia típica derivada del tumor 4T1 (2) se observó en todos los ratones con tumores con

respecto a los ratones normales (figura 5C). Esto fue acompañado por un aumento en los leucocitos como ya se informó (2) (figura 6E). La administración de THP no modificó el peso del bazo (figura 5C) ni el recuento de leucocitos (figura 6E). Se observó una pequeña disminución en el hematocrito y en los eritrocitos en todos los ratones portadores de 4T1 (figura 6A y B, respectivamente). No se produjeron cambios en el volumen corpuscular medio (VCM) ni en los valores de concentración de hemoglobina (figura 6C y D, respectivamente). Se observó un aumento en el recuento de plaquetas en ratones tratados con la dosis de 750 microgramos/kg (figura 6F).

Para estudiar las características histopatológicas, los tumores extirpados el día 7 del tratamiento se evaluaron mediante tinción de hematoxilina-eosina (H&E). La figura 7A-F muestra secciones representativas de tumores de grupos de control y experimentales con THP 1500 mg/kg/dosis. Se encontraron extensas áreas necróticas (30-50% de la masa tumoral) en tumores desarrollados en ratones tratados con THP (figura 7B). Por otro lado, los ratones de control mostraron necrosis focal (5-20%, figura 7A). Se observó un área fibrótica significativa en ratones tratados con THP (15-25%, figura 7D), mientras que la fibrosis apenas se observó en ratones de control (5%, figura 7C). La infiltración peritumoral de células inflamatorias (linfocitos, plasmocitos, mastocitos y algunos neutrófilos) fue más abundante en el control en comparación con los ratones tratados con THP (figura 7E y figura 7F, respectivamente). Los tumores 4T1 de crecimiento en ratones de control y tratados con THP muestran anaplasia (grado nuclear = 3), alto índice mitótico (grado mitótico = 3) y escasa diferenciación (índice histológico = 3) (figura 7A-F). El examen histológico del hígado reveló la presencia de metástasis localizadas en los espacios sinusoides, con aspecto esférico (figura 7G y figura 7H). Los animales tratados con THP mostraron metástasis de menor tamaño (menor número de células tumorales en la metástasis) que el control (figura 7H y figura 7G, respectivamente) y características histológicas normales (figura 7J). Por otro lado, el hígado de los animales de control mostró una importante citotoxicidad de los hepatocitos (figura 7I). La morfología y la estructura renales mostraron una degeneración turbia leve a moderada del epitelio tubular cortical renal en animales bajo tratamiento con THP y una degeneración turbia moderada del epitelio tubular cortical renal en animales de control. Se observó congestión pulmonar y esplenomegalia con hematopoyesis extramedular en ratones de control y tratados con THP.

El efecto de la administración s.c. de THP en el crecimiento de la estirpe celular tumoral 4T1 se resume a continuación.

Tabla 1:

Tabla 1 Efecto de la administración s.c. de THP sobre el crecimiento del tumor 4T1

Tratamiento con THP ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dosis}$)	Peso tumoral medio (g) \pm SEM	Tasa de crecimiento media SEM ($\text{mm}^3/\text{día}$)	% inhibición del crecimiento
Control	449,7 \pm 60,3	39,9 \pm 6,0	
187	277,3 \pm 21,0*	24,9 \pm 5,5	38
375	349,3 \pm 38,5	26,8 \pm 5,9	22
750	398,5 \pm 39,9	26,3 \pm 8,5	11
1500	267,7 \pm 23,5**	32,4 \pm 6,6	40

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ versus control

Cuando los tumores alcanzaron $128,6 \pm 7,9 \text{ mm}^3$, los ratones se trataron como se describe en Materiales y métodos. Cada grupo contenía 10 ratones. La tasa de crecimiento entre el día 1 del tratamiento y el día 7, final del experimento, se calculó como las pendientes de las curvas de crecimiento. Al final del experimento, el peso del tumor y el porcentaje de inhibición del crecimiento en tumores de ratones tratados con THP con respecto a los animales tratados con vehículo (control) se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

Células CT26:

En segundo lugar, se estudió el efecto de THP sobre el cáncer de colon CT26 en el crecimiento (3). Los ratones BALB/c portadores de tumor CT26 subcutáneo establecido (volumen medio del tumor, $88,6 \pm 12,0 \text{ mm}^3$) se trataron s.c. durante 7 días con THP a 375, 750 o 1500 microgramos/kg cada dos días o con vehículo. Como se muestra en la figura 8A, el tratamiento de ratones con 1500 mg/kg de THP inhibió significativamente el crecimiento del tumor CT26 en un 39% (Tabla 2) en el día 7, en relación con los controles tratados con vehículo ($P < 0,05$). Las tasas de crecimiento tumoral fueron menores en 750 y 1500 mg/kg de grupo tratado con THP en comparación con los animales tratados con vehículo (Tabla 2). Es importante destacar que los ratones parecieron tolerar el tratamiento con THP sin signos evidentes de toxicidad, con un aumento significativo del peso corporal en todos los grupos, incluidos los controles tratados con vehículo (figura 8B), y con esplenomegalia en todos los grupos portadores del tumor CT26 con respecto a ratones normales (figura 8C). Los índices

hematológicos no revelaron cambios en hematocrito, hemoglobina, leucocitos y plaquetas en animales normales en comparación con ratones portadores de CT26 tratados o no con THP (figura 9A, C, E y F). Sin embargo, se observó una disminución en los eritrocitos y un aumento de MCV en ratones tratados con 750 y 1500 microgramos/kg de THP (figura 9B y 9D, respectivamente).

Para estudiar las características histopatológicas, los tumores extirpados el día 7 del tratamiento se evaluaron mediante tinción con hematoxilina-eosina (H&E). La figura 10A-D representa unas secciones representativas de tumores de control y de grupos experimentales con THP 1500 mg/kg/dosis. Se encontraron áreas necróticas (15-20% de la masa tumoral) en tumores que crecieron en ratones tratados con THP (figura 10B y figura 10D) y los ratones de control mostraron áreas necróticas mínimas (5-10%, figura 10C). Los tumores CT26 que crecieron en ratones de control y tratados con THP exhiben anaplasia (grado nuclear = 3), alto índice mitótico (grado mitótico=3) y escasa diferenciación (índice histológico=3) y muestran una extensa vascularización intratumoral (figura 10A-D). La morfología y estructura renal mostraron una degeneración turbia leve del epitelio tubular cortical renal en animales bajo tratamiento con THP y una degeneración turbia moderada del epitelio tubular cortical renal en animales de control.

Se observó congestión pulmonar y esplenomegalia con hematopoyesis extramedular en ratones de control y tratados con THP.

El efecto de la administración s.c. de THP en el crecimiento de la estirpe celular de tumor CT26 se resume en la siguiente tabla 2:

Tabla 2 Efecto de administración s.c. de THP en el crecimiento del tumor CT26

Tratamiento con THP (µg/kg/dosis)	Volumen del tumor medio (mm ³) ± SEM	Tasa de crecimiento media SEM (mm ³)	% Inhibición del crecimiento
Control	502,5 ± 57,4	68,0 ± 9,6	
375	502,1 ± 188	71,3 ± 21,3	0
750	378,7 ± 68,8	50,3 ± 10,2	25
1500	307,7 ± 6,9 ^a	39,3 ± 6,4	39

*P<0,05

Cuando los tumores alcanzaron 88,6 ± 12,0 mm³, los ratones se trataron como se describe en Materiales y métodos. El grupo de control contenía 5 ratones y el grupo tratado con THP, 4 ratones. La tasa de crecimiento entre el día 1 del tratamiento y el día 7, final del experimento, se calculó como las pendientes de las curvas de crecimiento. Al final del experimento, el volumen del tumor y el porcentaje de inhibición del crecimiento en tumores de ratones tratados con THP con respecto a los animales tratados con vehículo (control) se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

Células B16:

Finalmente, se estudió el efecto de THP sobre el crecimiento del melanoma B16 (4). Los ratones C57BL portadores del tumor B16 subcutáneo establecido (volumen del tumor medio, 180,4 ± 13,2 mm³) se trataron s.c. durante 7 días con THP a 375, 750 o 1500 microgramos/kg cada dos días o con vehículo. Como se muestra en la figura 11A, el tratamiento de ratones con 375 mg/kg de THP inhibió significativamente el crecimiento del tumor B-16 en un 24% (Tabla 3) el día 7, en relación con los controles tratados con vehículo (P <0,05). La tasa de crecimiento del tumor fue menor en el grupo de 375 mg/kg tratado con THP en comparación con los animales tratados con vehículo (Tabla 3). Es importante destacar que los ratones parecieron tolerar el tratamiento con THP sin signos evidentes de toxicidad, con un aumento significativo del peso corporal en todos los grupos, incluidos los controles tratados con vehículo (figura 11 B), y con esplenomegalia significativa en 375 y 750 mg/kg de los grupos tratados con THP con respecto a los controles y grupo normal (figura 11C).

Una disminución en los índices eritropoyéticos acompañó el crecimiento del tumor B16 como ya se describió (5). Una disminución en el hematocrito, eritrocitos y hemoglobina fue evidente en todos los ratones con tumor B16 y el tratamiento con THP no modificó estos parámetros (figura 12A, B y C, respectivamente). El MCV fue normal en todos los grupos. El recuento de leucocitos disminuyó en animales portadores de tumores B16 tratados con vehículo (control) o tratados con 1500 microgramos/kg de THP. El tratamiento con THP 375 y 750 microgramos/kg aumentó con el número de células sanguíneas a niveles similares a los de ratones normales (figura 12E). No se observaron cambios en el recuento de plaquetas entre todos los grupos estudiados (figura 12F).

Para estudiar las características histopatológicas, los tumores extirpados el día 7 del tratamiento se evaluaron mediante tinción con hematoxilina-eosina (H&E). La figura 13A-D muestra secciones representativas de tumores de grupos de control y experimentales con THP de 375 mg/kg/dosis. Se encontraron extensas áreas necróticas

(40-55% de la masa tumoral) en tumores que crecen en ratones tratados con THP (figura 13B y figura 13D). Por otro lado, los ratones de control mostraron una menor necrosis (30-35%, figura 13A y figura 13C) y desorganización en comparación con los tumores tratados con THP (figura 13B y figura 13D). Se observó un área fibrótica significativa en los ratones tratados con THP (35%, figura 13B), mientras que la fibrosis apenas se observó en los ratones de control (10%, figura 13A). Los tumores B16 que crecieron en ratones de control y tratados con THP exhiben anaplasia (grado nuclear=3), alto índice mitótico (grado mitótico=3), escasa diferenciación (índice histológico=3) y muestran una extensa vascularización intratumoral (figura 13A-D). La morfología y estructura renales mostraron una degeneración turbia moderada del epitelio tubular cortical renal, tanto en animales bajo tratamiento con THP como de control. Se observó congestión pulmonar e hiperplasia del epitelio bronquiolar y esplenomegalia con hematopoyesis extramedular en ratones de control y tratados con THP.

El efecto de la administración s.c. de THP sobre el crecimiento de la estirpe celular tumoral B16 se resume en la siguiente tabla 3:

Tabla 3 Efecto de la administración s.c. de THP sobre el crecimiento del tumor B16

Tratamiento con THP (µg/kg/dosis)	Peso de tumor medio (g) ± SEM	Tasa de crecimiento media SEM (mm ³ /día)	% Inhibición del crecimiento
Control	791,2 ± 74,5	100,2 ± 11,3	
375	598,5 ± 51,4*	82,1 ± 8,6	24
750	710,9 ± 49,5	104,6 ± 11,8	10
1500	691,3 ± 79,5	116,9 ± 16,5	12

*P<0,05

Cuando los tumores alcanzaron 180,4 ± 13,2 mm³, los ratones se trataron como se describe en Materiales y métodos. Cada grupo contenía 8 ratones. La tasa de crecimiento entre el día 1 del tratamiento y el día 7, final del experimento, se calculó como las pendientes de las curvas de crecimiento. Al final del experimento, el peso del tumor y el porcentaje de inhibición del crecimiento en tumores de ratones tratados con THP con respecto a los animales tratados con vehículo (control) se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

Conclusión del Informe del efecto antitumoral de THP:

Como se puede apreciar en los resultados presentados en la tabla 1, la THP inhibe el crecimiento del tumor 4T1 en ratones BALB/c que reciben una dosis de 187 µg/kg o superior. Los valores más altos obtenidos en porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se alcanzan a dosis de 187 µg/kg y 1500 µg/kg (valor más alto). La dosis intermedia entre 187 µg/kg y 1500 µg/kg mostró un porcentaje menor en la inhibición del crecimiento tumoral. Es importante aclarar que los ratones parecieron tolerar el tratamiento con THP sin signos evidentes de toxicidad y sin variación de los pesos corporales en comparación con el grupo de control.

Como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 2, THP inhibe el crecimiento del tumor CT26 en ratones BALB/c que reciben una dosis superior a 750 µg/kg. El valor más alto obtenido en porcentaje de la inhibición del crecimiento del tumor se alcanza a una dosis de 1500 µg/kg (valor más alto). Es importante aclarar que los ratones parecieron tolerar el tratamiento con THP sin signos evidentes de toxicidad y con un aumento significativo del peso corporal en todos los grupos, incluido el grupo de control.

Como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 3, la THP inhibe el crecimiento del tumor B16 en ratones C57BL que reciben una dosis de 375 µg/kg (valor más alto). La dosis más alta (750-1500 µg/kg) no produce un aumento en el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral. Es importante aclarar que los ratones parecieron tolerar el tratamiento con THP sin signos evidentes de toxicidad y con un aumento significativo del peso corporal en todos los grupos, incluido el grupo de control.

Como conclusión de lo anterior, la THP se podría usar en el tratamiento de diferentes estirpes de células tumorales en pacientes con tolerancia sin signos evidentes de toxicidad.

Conclusión final

El ensayo 1-6 demuestra que el tratamiento con THP como un derivado pegilado inhibe el crecimiento del sarcoma ascítico T 180, SARCOMA-180 sólido, y produce una acción antiinfecciosa que aumenta la respuesta inmunitaria innata en los mamíferos. Se obtuvieron resultados similares en el INFORME DE EFECTO ANTITUMOR DE THP con respecto a la inhibición del crecimiento de tumores 4T1, CT26 y B16, lo que confirma la observación previa en SARCOMA-180. De las diferentes estirpes de células tumorales utilizadas se deduce que la THP se puede usar eficazmente en la administración terapéutica para inhibir el crecimiento tumoral.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de inhibir el desarrollo de tumores en mamíferos que comprende una cantidad eficaz de glucoproteína de Tamm-Horsfall humana, natural o pegilada, y un excipiente farmacológicamente aceptable.
- 10 2. Composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de inhibir el desarrollo de tumores en mamíferos según la reivindicación 1, en la que dicha utilización comprende administrar parenteralmente al mamífero dicha composición.
3. Composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de inhibir el desarrollo de tumores en mamíferos según la reivindicación 1 o 2, en la que la glucoproteína de Tamm-Horsfall humana está pegilada con tresilato de polietilenglicol (PEG).

Fig. 1

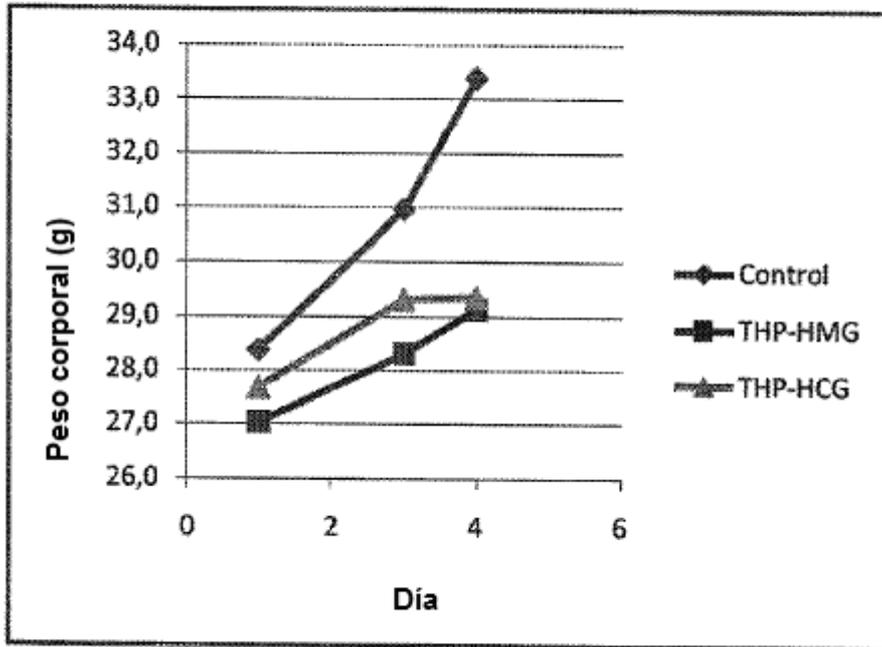
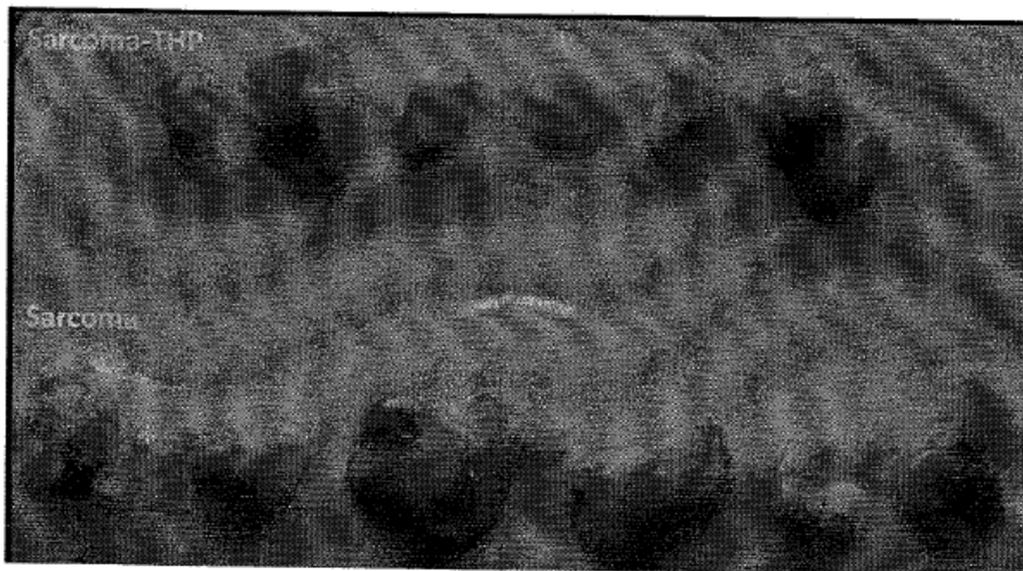


Fig. 2

Tumores diseccionados



* tumor ulcerado

Fig. 3

Tumores diseccionados

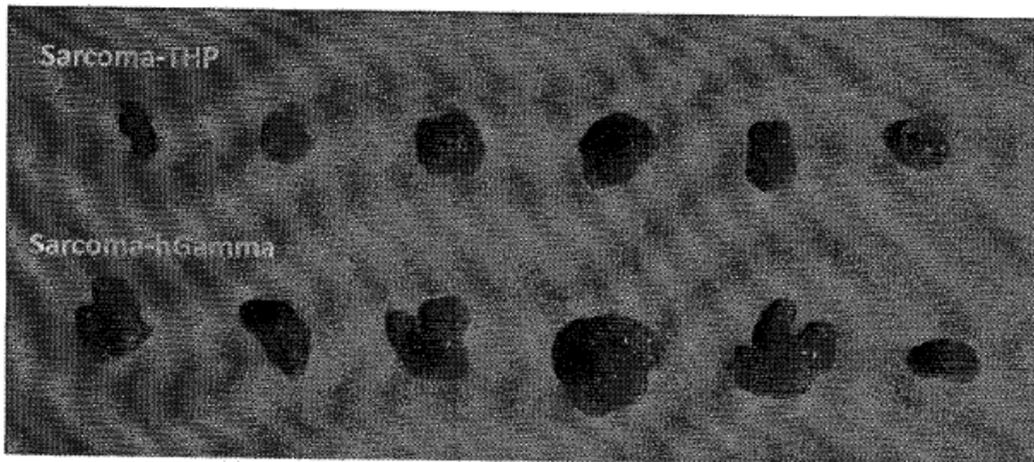
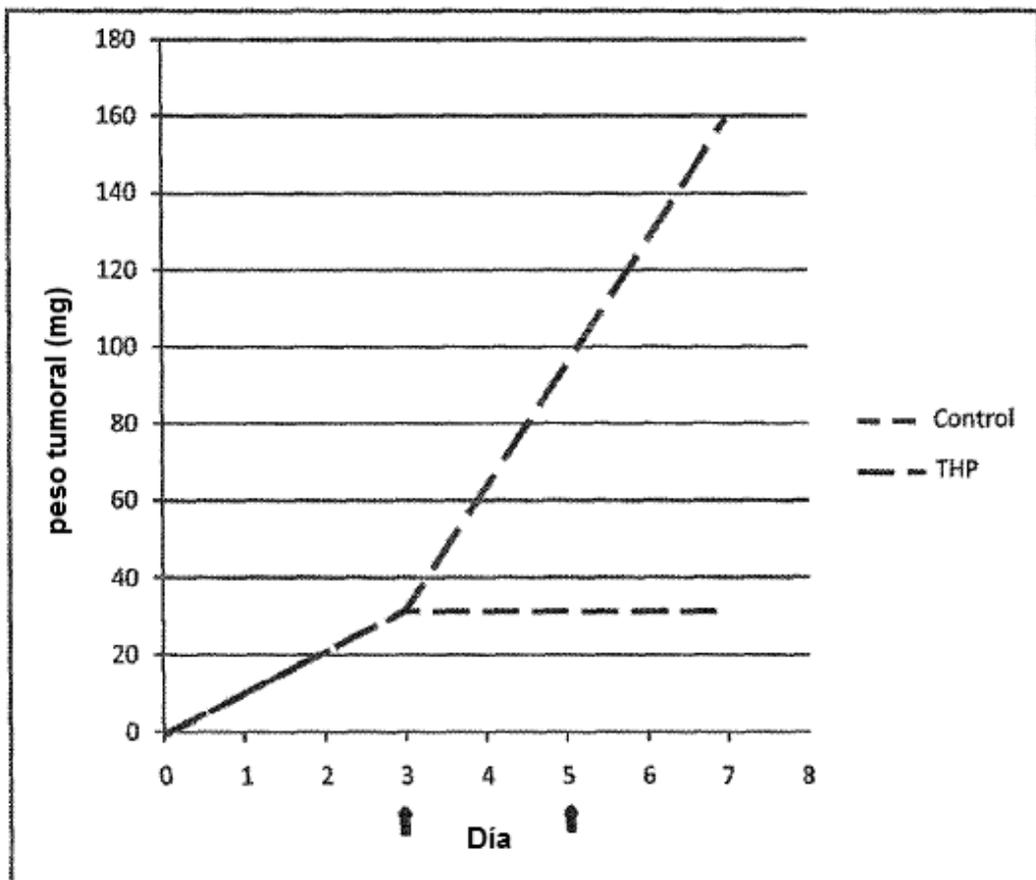


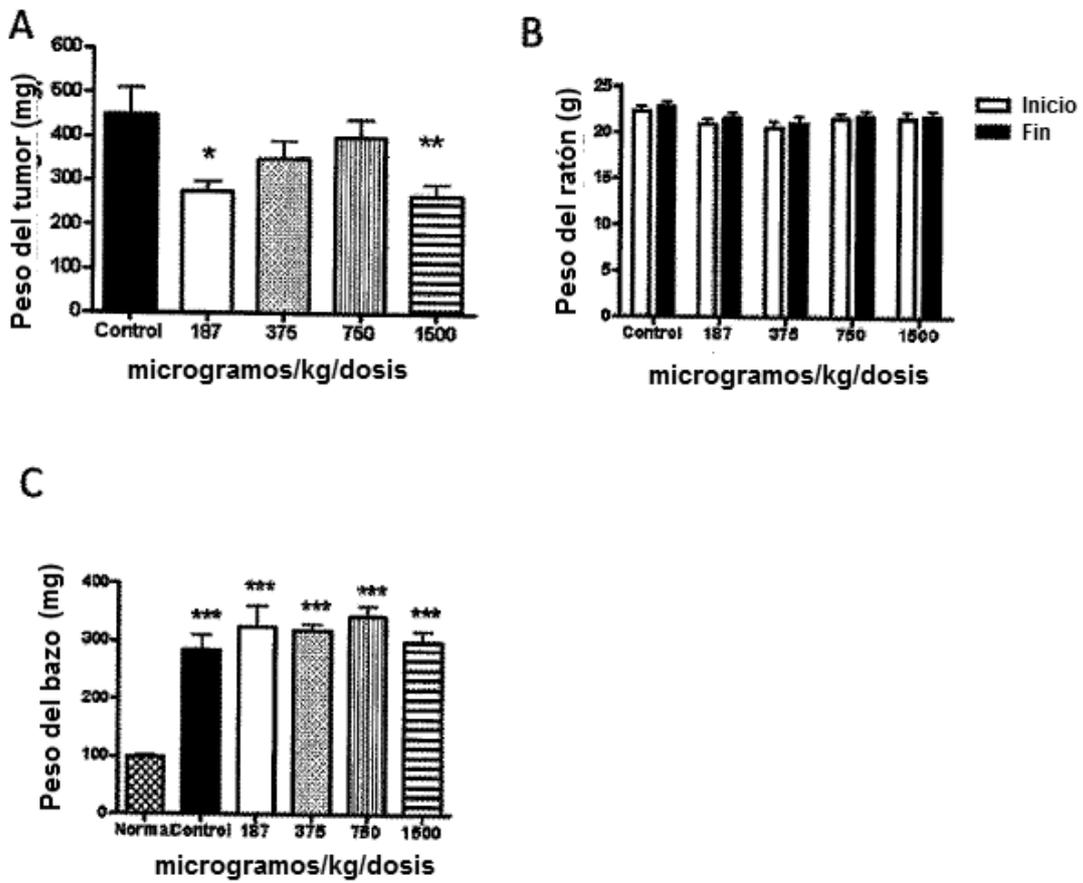
Fig 4

Peso medio de tumores en los grupos 2 y 3.



Inyecciones de THP

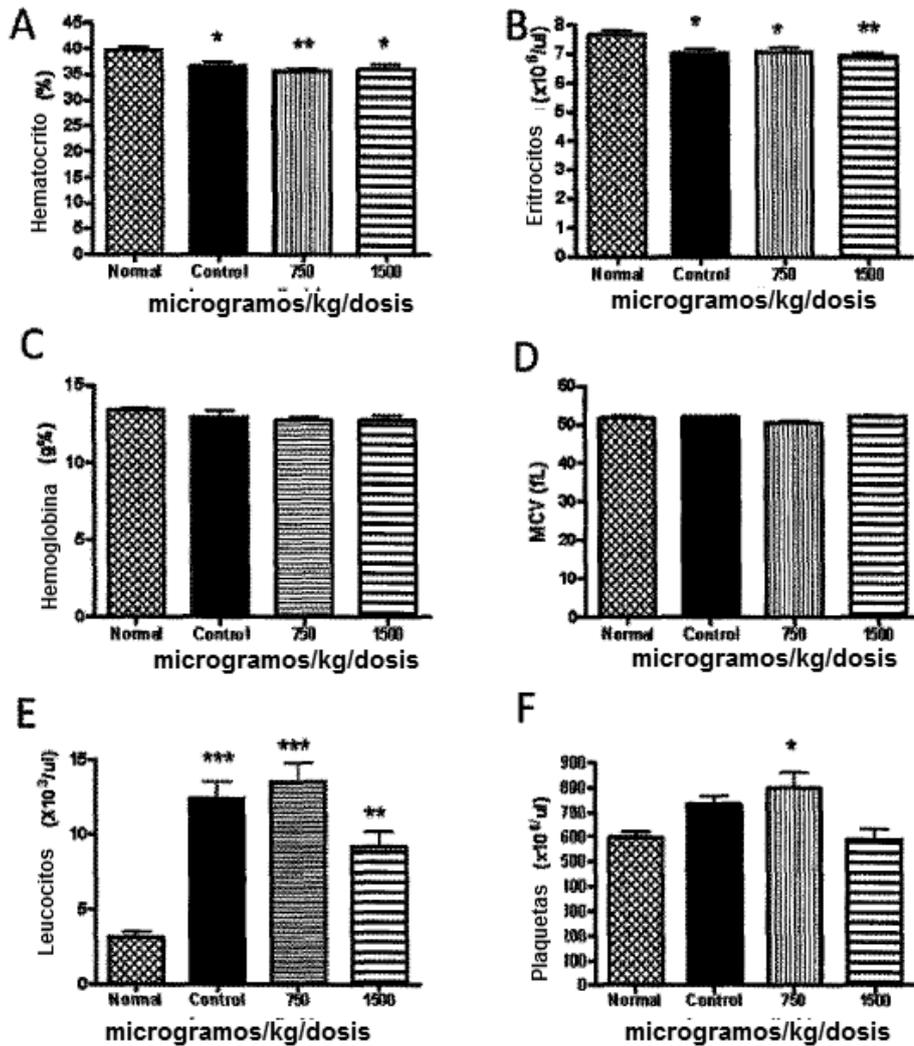
Fig 5



Efecto de la administración de THP sobre los ratones portadores de cáncer de mama 4T1.

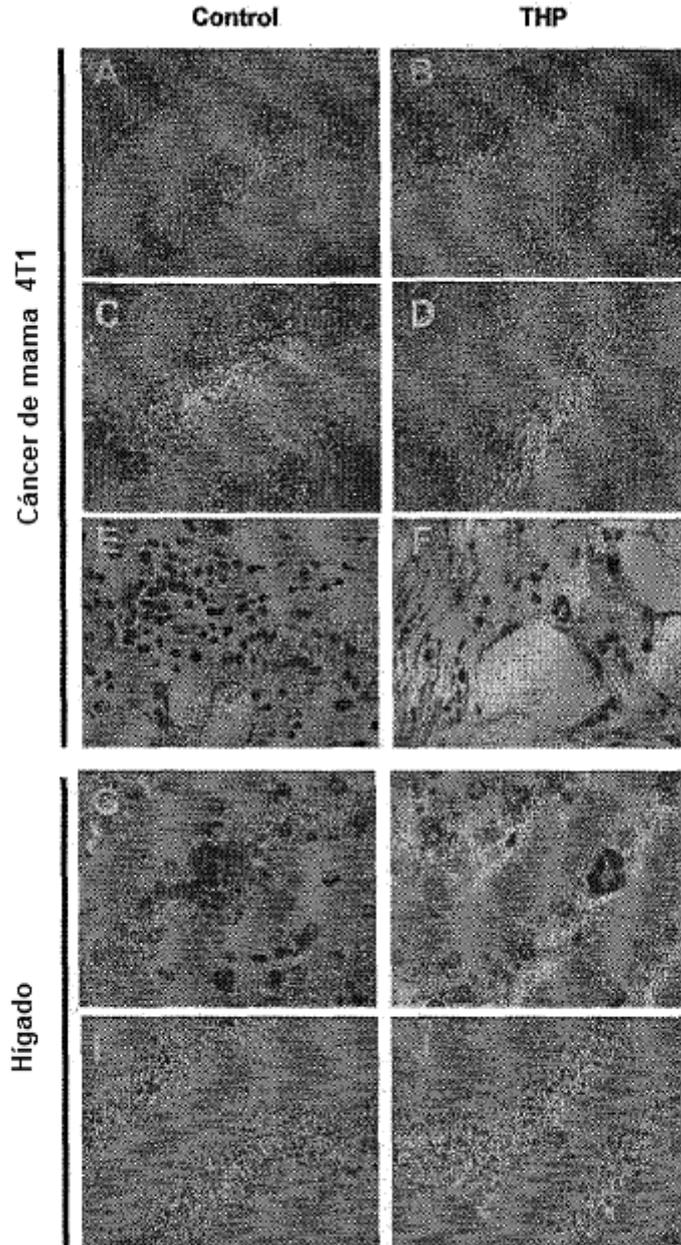
Cuando los tumores alcanzan $128.6 \pm 7.9 \text{ mm}^3$ (día 1) se administró THP s.c. a 187, 375, 750 y 1500 mg/kg/día tres veces cada dos días, y el día 7 se sacrificaron los animales. (A) Peso del tumor. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (B) Peso del animal al inicio (día 1) y al final (día 7) del experimento. (C) Peso del bazo *** $P < 0,001$. Los datos se muestran como media \pm SEM (n=10).

Fig. 6



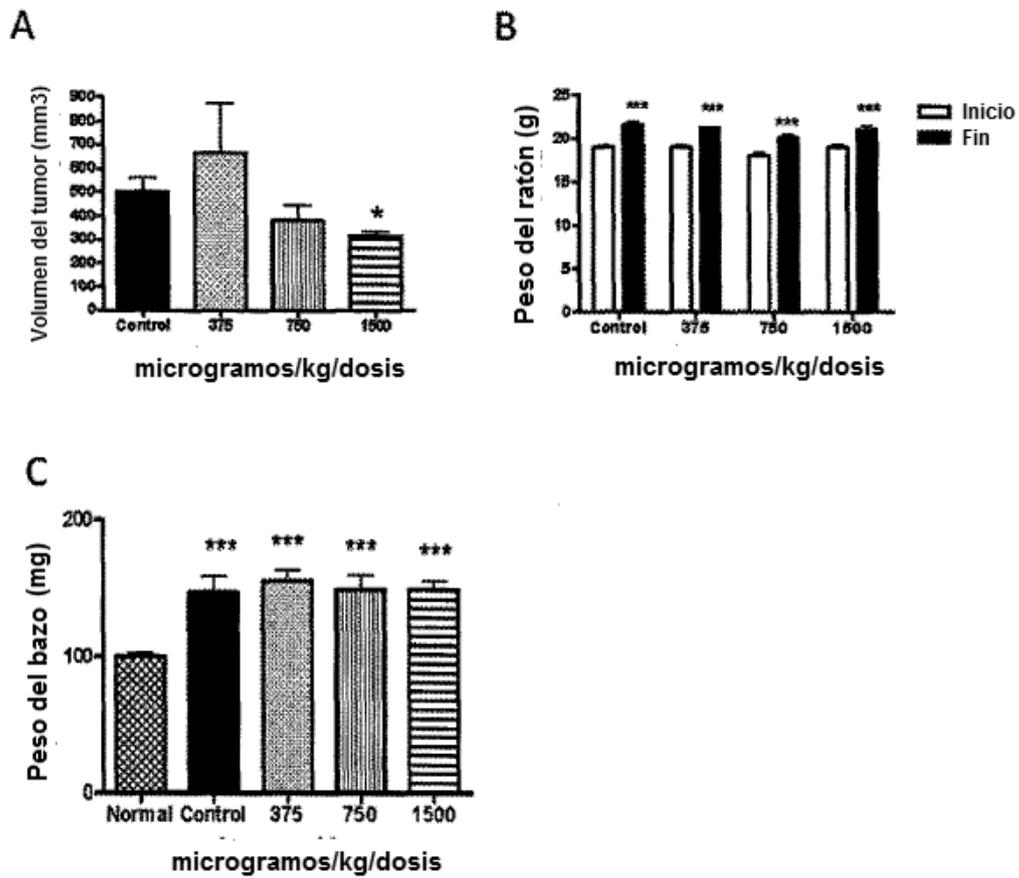
Efecto de la administración de THP sobre los índices hematológicos en ratones portadores de cáncer de mama 4T1. Al final del experimento (día 7 de tratamiento.) (A) hematocrito, (B) eritrocitos, (C) hemoglobina, (D) volumen corpuscular medio (MCV), (E) leucocitos, y (F) recuento de plaquetas se determinaron en sangre periférica de ratones. Se usaron animales sanos normales (n=9), ratones con tumores con vehículo (control) o con diferentes dosis de THP (n=10). *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 versus ratones normales. Los datos se muestran como media ± SEM.

Fig 7



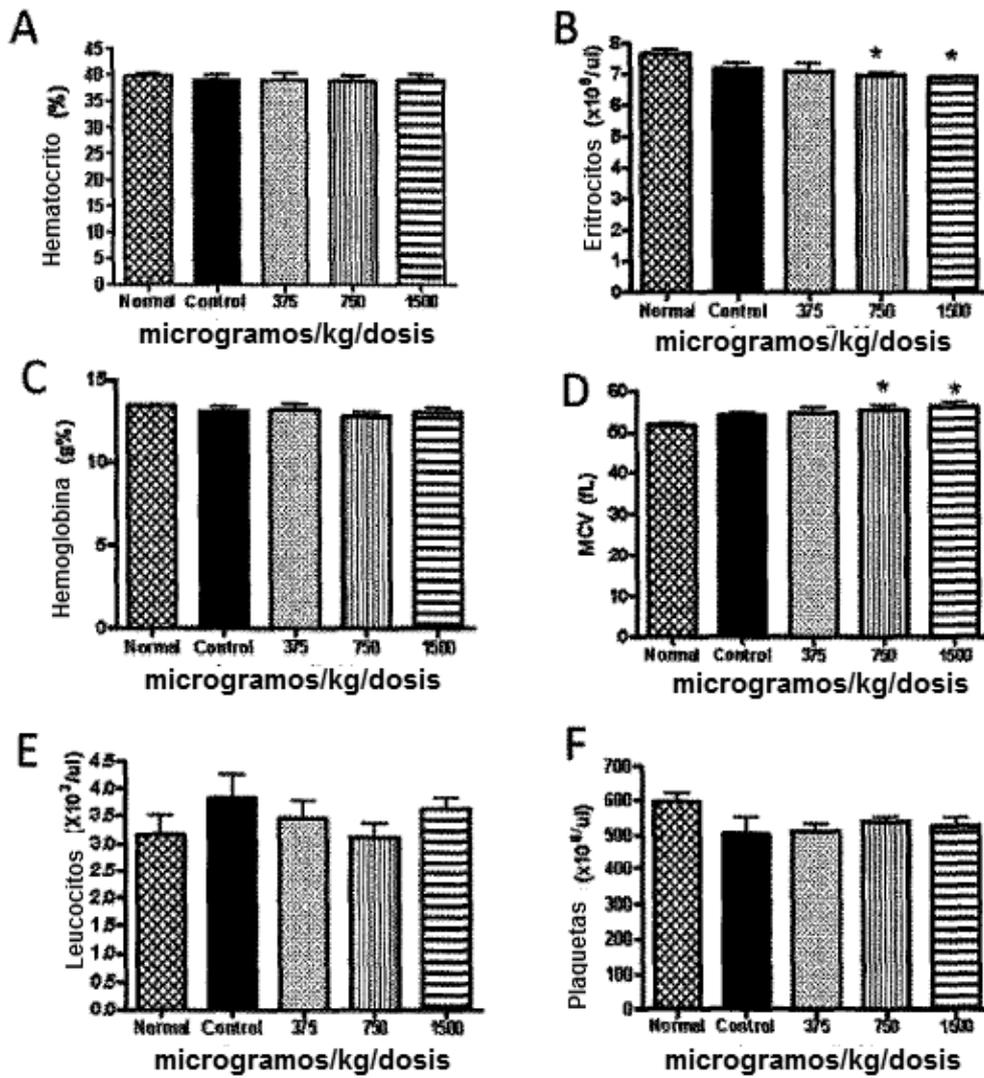
Análisis histológico de tumores 4T1 e hígado de ratones tratados con THP. Al final del experimento (día 7 de tratamiento), el tumor y el hígado se fijaron y se incluyeron en parafina como se describe en la sección Material y métodos. Sección tisular de tumores de ratones de control (A, C y E) y tratados con THP (B, D y F). Se muestran tumores altamente necróticos y extensas áreas fibróticas de ratones tratados con THP (B y D) en comparación con los ratones de control (A y C). El infiltrado inflamatorio es más abundante en ratones de control versus ratones tratados con THP (E vs. F). Las metástasis hepáticas son más pequeñas en THP versus ratones de control (H vs. G). La citotoxicidad hepática está presente en los ratones de control (I). (A-D) H&E x 50; (E y F) H&E x 400; (G y H) H&E x 200; (I y J) H&E x 50.

Fig 8



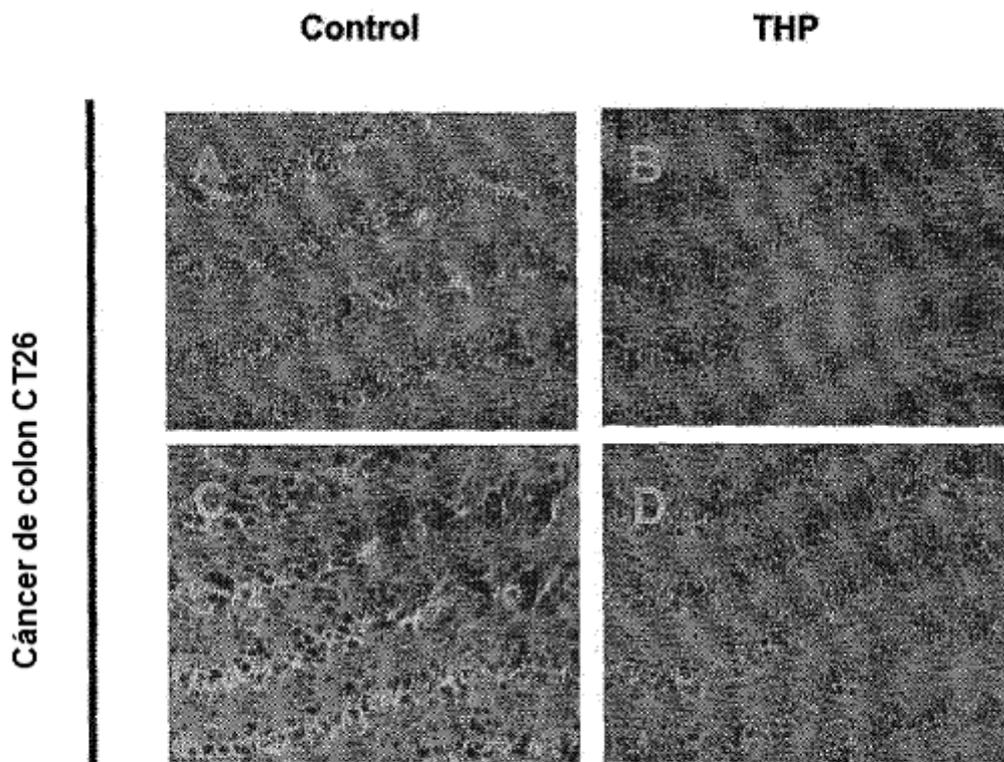
Efecto de la administración de THP sobre los ratones portadores de cáncer de colon CT26. Cuando los tumores alcanzan $88,6 \pm 12,0 \text{ mm}^3$ (día 1) se administró THP s.c. a 375, 750 y 1500 mg/kg/día tres veces cada dos días, y en el día 7 se sacrificaron los animales. (A) Volumen del tumor en el día 7. * $P < 0,05$. (B) Peso del animal en el inicio (día 1) y en el final (día 7) del experimento. *** $P < 0,001$. (C) Peso del bazo *** $P < 0,001$. Los datos se muestran como media \pm SEM (n=5).

Fig 9



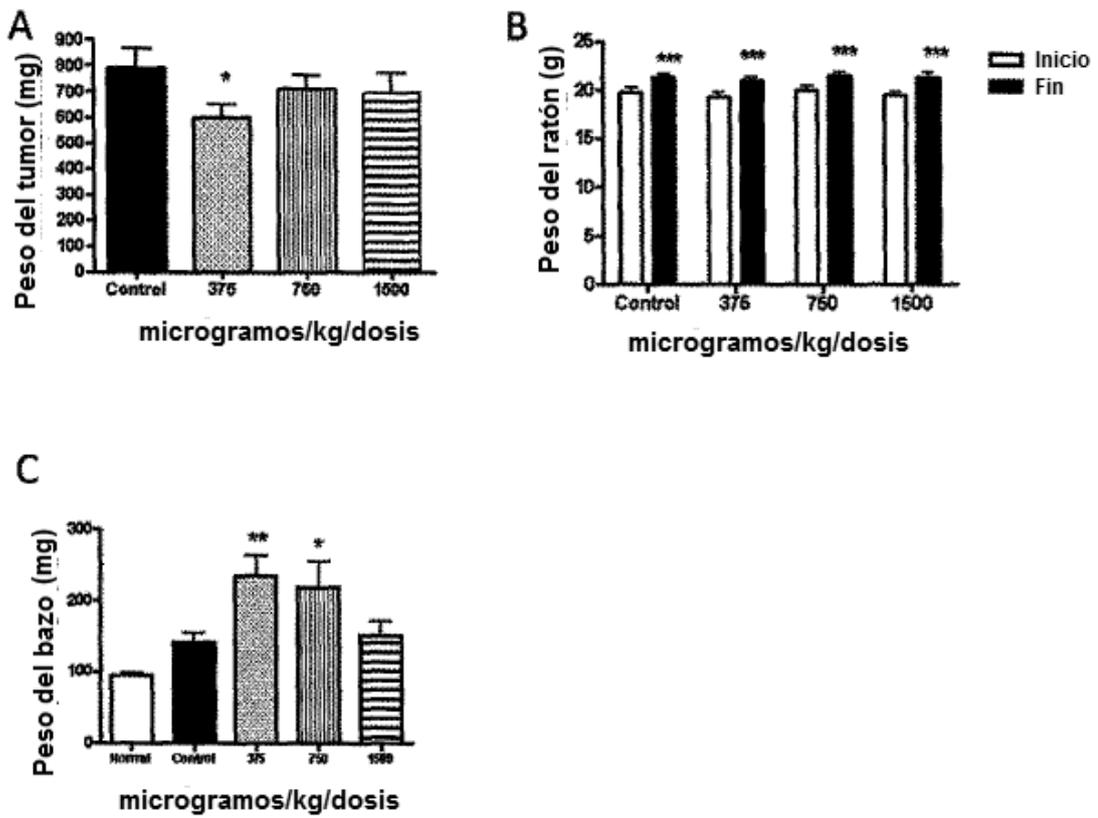
Efecto de la administración de THP sobre los índices hematológicos en ratones portadores de cáncer de colon CT26. Al final del experimento (día 7 de tratamiento.) (A) hematocrito, (B) eritrocitos, (C) hemoglobina, (D) volumen corpuscular medio (MCV), (E) leucocitos, y (F) recuento de plaquetas se determinaron en sangre periférica de los ratones. Se usaron animales sanos normales (n=9), ratones con tumores tratados con vehículo (control, n=5) o con diferentes dosis de THP (n=4). *P<0,05 versus ratones normales. Los datos se muestran como media \pm SEM.

Fig 10



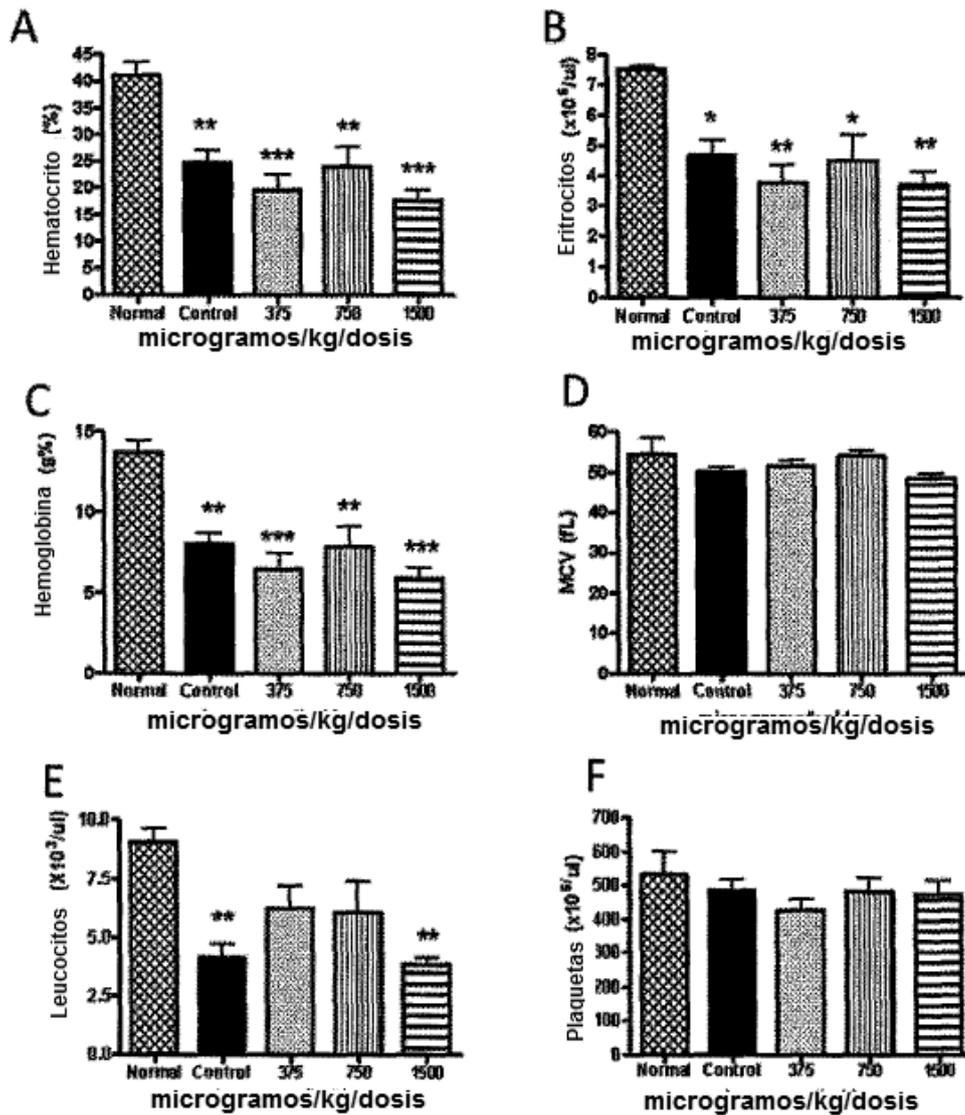
Análisis histológico de tumores CT26 de ratones tratados con THP. Al final del experimento (día 7 de tratamiento), los tumores se fijaron y se incluyeron en parafina como se describe en la sección Material y métodos. Sección de tejido de tumores de ratones de control (A y C) y tratados con THP (B y D). Se muestran áreas tumorales necróticas de ratones tratados con THP (B y D) en comparación con los ratones de control (A y C). La vascularización intratumoral es evidente (A-D), H&E x 100.

Fig 11



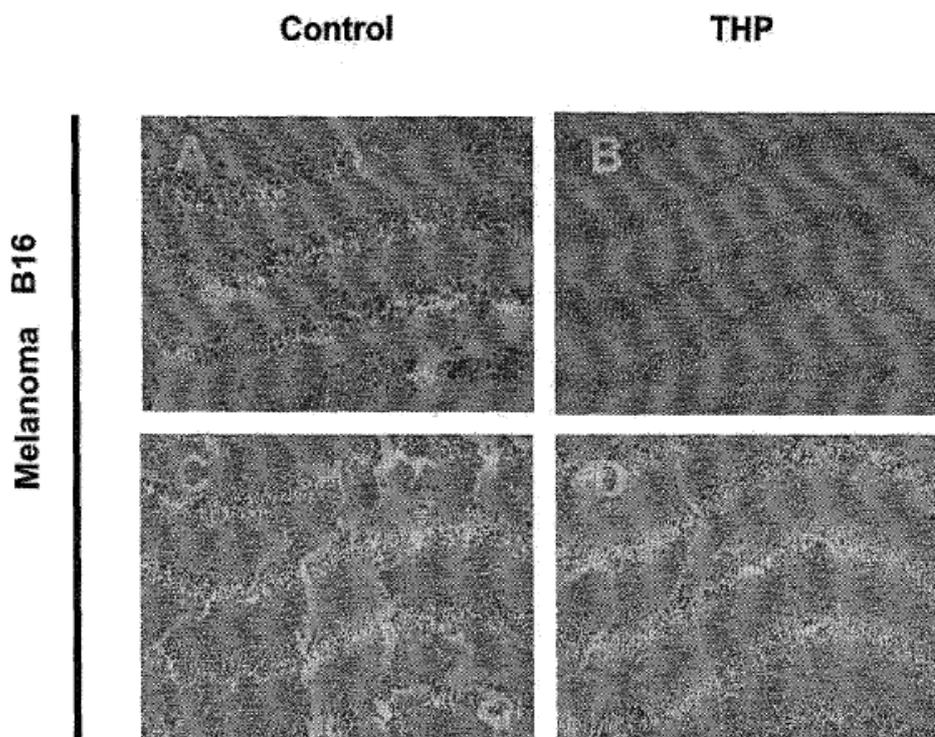
Efecto de la administración de THP sobre los ratones portadores de melanoma B16. Cuando los tumores alcanzan $180,4 \pm 13,2 \text{ mm}^3$ (día 1) se administró THP s.c. a 375, 750 y 1500 mg/kg/día tres veces cada dos días, y el día 7 se sacrificaron los animales. (A) Peso del tumor. * $P < 0,05$. (B) Peso del animal al inicio (día 1) y al final (día 7) del experimento. *** $P < 0,001$. (C) Peso del bazo * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Los datos se muestran como media \pm SEM (n=8).

Fig 12



Efecto de la administración de THP sobre los índices hematológicos en ratones portadores de B16 melanoma. Al final del experimento (día 7 de tratamiento.) (A) hematocrito, (B) eritrocitos, (C) hemoglobina, (D) volumen corpuscular medio (MCV), (E) leucocitos, y (F) recuento de plaquetas se determinaron en sangre periférica de ratones. Se usaron animales sanos normales (n=6), ratones con tumores tratados con vehículo (control) o con diferentes dosis de THP (n=8). *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 versus ratones normales. Los datos se muestran como media \pm SEM.

Fig. 13



Análisis histológico de tumores B16 de ratones tratados con THP. Al final del experimento (día 7 de tratamiento), los tumores se fijaron y se incluyeron en parafina como se describe en la sección Material y métodos. Sección de tejido de tumores de ratones de control (A y C) y tratados con THP (B y D). Se muestran tumores altamente necróticos y extensas áreas fibróticas de ratones tratados con THP (B y D) en comparación con los ratones de control (A y C). La vascularización intratumoral es evidente (A-D), H&E x 50.